

明細書

ヒト由来免疫担当細胞の製造方法

5 技術分野

本発明は、ヒトリンパ系細胞と抗原提示細胞など免疫応答に必須なる種々の細胞の生体内増殖、及びヒト免疫系の再構築の技術に関する。

背景技術

10 ヒト幹細胞に関する研究は、生体内で測定することが重要であることから、免疫不全げっ歯類、又はヒツジ胎仔(Flake, A. W. et al., 1986. *Science* 233:776-778.)を用いた異種動物間移植に基づいて行われている。Scid-huアッセイは、McCune らにより 1988 年に報告されており(Science 241: 1632-1639 (1988))、このアッセイはヒト細胞を CB17/SCID マウスで検出した最初の例である。その後、
 15 ヒト造血細胞を移植するためのレシピエントとして、NOD/SCID(Pflumio, F. et al., 1996. *Blood* 88:3731-3740.)、NOD/RAG-1^{null}(Shultz, L. D. et al., 2000. *Journal of Immunology* 164:2496-2507.)、beige/nude/scid(Dao, M. A., and J. A. Nolta. 1998. *International Journal of Molecular Medicine* 1:257-264.)又は NOD/SCID/β 2M^{null}(Kollet, O. et. al., 2000. *Blood* 95:3102-3105.)等の免疫不全マウスが多く用いられている。
 20

しかしながら、異種動物間の幹細胞移植のレシピエントとして使用されるマウスは、8~12 週齢の成体マウスであることがほとんどである。また、通常の成体 SCID マウスを用いた場合において移植片を長期間維持させるには外来性サイトカインの投与が必要となり、T 細胞を前駆細胞から分化させることが困難である
 25 (Ito, M. et al., 2002. *Blood* 100:3175-3182.)。

発明の開示

本発明は、ヒト免疫系を異種動物宿主に構築させ、免疫反応を自然又は人為的

に起こすことにより、必要とされるヒト免疫細胞、特に抗原特異的な T 細胞、B 細胞や、免疫グロブリン、サイトカイン等を産生させることを目的とする。

本発明者は上記課題を解決するため銳意研究を行った結果、免疫不全動物に造血前駆細胞又は成熟造血細胞を移植することにより上記課題を解決し得ることを
5 見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) ヒト由来造血前駆細胞又は成熟造血細胞が移植された幼若な(胎児から新生児を経て生殖年令に達するまでを含む)免疫不全哺乳動物(ヒトを除く)であって、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を
10 產生することができる前記動物である。また、本発明は、上記幼若な免疫不全哺乳動物(ヒトを除く)を飼育してなる免疫不全哺乳動物又はその子孫である。

上記幼若な免疫不全哺乳動物としては、例えば新生児免疫不全哺乳動物又は胎児免疫不全哺乳動物が挙げられる。

また、上記造血前駆細胞としては、骨髓由来、臍帯血由来、動員(G-CSF)末梢血、
15 ES 細胞由来中肺葉系細胞又は末梢血由来の細胞例示することができる。これらの細胞は、例えば、CD34 陽性のもの(例えば CD34⁺細胞、CD133⁺細胞、SP 細胞、CD34⁺CD38⁻細胞、c-kit⁺細胞あるいは CD3⁻、CD4⁻、CD8⁻及び CD34⁺細胞のもの)が挙げられる。また、免疫担当細胞としては B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つが挙げられる。これら免疫担当細胞は、末梢血からレシピエントを殺すことなく採取可能であり、より多数の細胞、又は前記免疫担当細胞由来の生理活性物質(例えば免疫グロブリン、サイトカイン等)を精製する場合に、骨髓、脾臓、胸腺、リンパ節などを細胞源として利用することが可能である。免疫不全哺乳動物は免疫不全マウスであることが好ましい。上記の免疫グロブリンは、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD 及び IgE など
20 の全てのアイソタイプが含まれる。

(2) さらに、本発明は、ヒト由来造血前駆細胞又は成熟造血細胞を幼若な免疫不全哺乳動物(ヒトを除く)に移植することを特徴とする、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる

動物又はその子孫の作製方法である。幼若な免疫不全哺乳動物としては、例えば新生児免疫不全哺乳動物又は胎児免疫不全哺乳動物が挙げられる。また、造血前駆細胞としては、骨髓由来、臍帯血由来、動員(G-CSF)末梢血、ES 細胞由来中肺葉系細胞又は末梢血由来の細胞を例示することができる。これらの細胞は、例えば、CD34 陽性のもの（例えば CD34⁺細胞、CD133⁺細胞、SP 細胞、CD34+CD38-細胞、c-kit⁺細胞あるいは CD3⁻、CD4⁻、CD8⁻及び CD34⁺細胞のもの）が挙げられる。免疫担当細胞としては、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つが挙げられる。また、生理活性物質としては、例えばサイトカイン及び/又は免疫グロブリンが挙げられる。上記の免疫グロブリンは、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD 及び IgE などの全てのアイソタイプが含まれる。免疫不全哺乳動物は免疫不全マウスであることが好ましい。

(3) さらに、本発明は、前記免疫不全哺乳動物又はその子孫から免疫担当細胞を回収し、当該免疫担当細胞を抗原又は適切な刺激物質の存在下で培養し、得られる培養物からヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法である。免疫担当細胞としては、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つが挙げられる。

(4) さらに、本発明は、前記免疫不全哺乳動物又はその子孫を抗原又は刺激物質で免疫し、得られる免疫動物から当該ヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法である。抗体の採取源としては、例えば血漿又は血清が挙げられる。

(5) また、本発明は、前記免疫不全哺乳動物又はその子孫に、細菌、ウイルス、腫瘍細胞及び腫瘍抗原ペプチドからなる群から選択されるいずれかのものが投与された疾患モデル動物又はその子孫である。上記疾患には、感染症を挙げることができる。

(6) 本発明は、被験物質を、前記免疫不全哺乳動物若しくはその子孫又は前記感染症動物若しくはその子孫に投与して、被験物質の有効性を評価することを特徴とする、免疫関連医薬のスクリーニング方法である。免疫関連医薬には、ワクチン、抗ウイルス薬や抗生素も含まれる。また、前記方法は、本発明のヒト抗体に

に対する免疫応答及びアレルギーに対する安全性確認（特に前臨床試験段階）において有用である。

(7) 本発明は、前記免疫不全哺乳動物又はその子孫から免疫担当細胞を回収することを特徴とする前記免疫担当細胞の製造方法である。

5 (8) 本発明は、前記免疫不全哺乳動物又はその子孫から回収された免疫担当細胞である。

(9) 本発明は(8)記載の免疫担当細胞を含むワクチンである。

(10) 本発明は、前記疾患モデル動物又はその子孫から免疫担当細胞を回収することを特徴とする前記免疫担当細胞の製造方法である。

10 (11) 本発明は、前記疾患モデル動物又はその子孫から回収された免疫担当細胞である。

(12) 本発明は(11)記載の免疫担当細胞を含むワクチンである。

(13) 本発明は、前記疾患モデル動物又はその子孫から回収されたヒト由来抗体である。

15 (14) 本発明は、前記免疫担当細胞を抗原又は刺激物質の存在下で培養した培養物から採取されたヒト由来抗体である。

(15) 本発明は、疾患モデル動物又はその子孫から回収されたヒト由来抗体である。

(16) 本発明は、(15)記載のヒト由来抗体を含むワクチンである。

20 図面の簡単な説明

図1 Aは、レシピエントマウスにおけるヒトB細胞系（CD19⁺細胞）の再構築を示す図である。

図1 Bは、レシピエントマウスに各種ヒト免疫グロブリンの発現を示す図である。

25 図2は、OVA特異的IgMのELISAの結果を示す図である。

図3は、レシピエントマウスの骨髓、脾臓及び末梢血におけるヒトT細胞系の再構築を示す図である。

図4は、リンパ系組織のFISH解析及び免疫組織学的解析の結果を示す図である。

図 5 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスの骨髄(BM)におけるヒト赤血球構成物の同定を示す図である。

図 6 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスの BM 及び脾臓におけるヒト B 細胞発生を示す図である。

5 図 7 は、CD19⁺ B 系細胞におけるヒト免疫グロブリンの発現を示す図である。

図 8 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスにおけるヒト T 細胞の発生を示す図である。

図 9 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスの脾臓におけるヒト樹状細胞の存在を示す図である。

10 図 10 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスの腸管における粘膜免疫の発生を示す図である。

図 11 は、卵白アルブミンによる免疫に続く IgG⁺細胞の誘導を示す図である。

図 12 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスで產生したヒト T 細胞によって介される同種異型標的細胞に対する細胞毒性を示した図である。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明はヒト造血系細胞を異種哺乳動物の生体内で分化、増殖させ、異種哺乳動物においてヒト免疫系を再構築させようとして完成されたものである。具体的には、ヒト由来の造血前駆細胞を宿主である幼若な免疫不全哺乳動物（例えば SCID マウス）に移植し、当該宿主内でヒト由来細胞を分化及び増殖させることを特徴とするものである。すなわち、ヒト免疫系及び造血系を免疫不全動物の体内を利用して構築するシステムを利用して、ヒト抗体の產生及び腫瘍又はウイルス抗原特異的ワクチンの開発に応用することが可能である。

25

1. 幼若な免疫不全哺乳動物

本発明において、ヒト由来の造血前駆細胞を移植するためのレシピエントとして使用される動物は、ヒトを除く免疫不全哺乳動物である。本発明において「幼

「若な」動物とは、胎児から新生児を経て生殖年令に達するまでを含み、好ましくは、胎児及び生後 7 日以内、より好ましくは生後 2 日以内の新生児である。幼若な免疫不全哺乳動物をレシピエントとして用いると、個体の成長に伴ってヒト免疫担当細胞も効率的に増殖するため、本発明では幼若な個体を用いることが好ましい。

哺乳動物としては、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、羊、ミニブタ、ブタ、サルなどが挙げられる。モデル動物が豊富であり、系統が確立されている点で免疫不全マウスであることが好ましい。免疫不全マウスとは、T 細胞及び B 細胞の生産能を欠く重症複合免疫不全マウス (SCID マウス) を意味し、特に、NK 細胞の活性を持たない NOD/SCID/β 2 ミクログロブリンノックアウトマウス (NOD/SCID/B2M) や NOD/SCID/common γ-chain ノックアウトマウスが好ましい。この SCID マウスの幼若な個体を使うと、マウス生体内にヒト由来免疫細胞及び造血細胞を高率に產生させることができる。上記 SCID マウスは市販されており (Jackson Laboratory)、当業者であれば容易に入手することが可能である。

15

2. 細胞の調製及び移植

移植の対象となる造血前駆細胞は、例えば臍帯血、骨髓、末梢血、動員 (G-CSF) 末梢血、ES 細胞由来中肺葉系細胞から得ることができるが、臍帯血が好ましい。

臍帯血 (CB) 細胞は、臨床検体（例えば臨床検査等が済んで細胞数の問題や家族歴の問題から廃棄の対象となった検体）を日本赤十字センター臍帯血バンクから得ることが可能である。また、骨髓細胞は、骨髓バンクから得ることも、骨髓穿刺によって採取された細胞、又はそのうち廃棄の対象となる細胞から得ることもできる。末梢血は、一般的血液検査に使用するために採取した血液又はその廃棄対象血液を使用することができる。また、末梢血中の幹細胞集団をより効率良く取るには、G-CSF により骨髓中の幹細胞を動員させたあとに採取することも可能である。

次に、単核細胞 (MNCs) を密度勾配遠心により上記細胞から単離する。

本発明において移植に使用される細胞は、例えば CD34 陽性 (CD34⁺、CD133⁺ 細

胞、SP 細胞、CD34⁺CD38⁻細胞、c-kit⁺細胞) を表す細胞、すなわち造血前駆細胞又は成熟造血細胞である。CD34⁺細胞は、試料を抗ヒト CD34 ミクロビーズとともにインキュベートすることにより得ることができる。

上記造血前駆細胞源となる試料中には、造血前駆細胞のほかに T 細胞に分化した細胞が含まれている。そこで、そのような T 細胞を除去するために、T 細胞マーカーに対する抗体を反応させることもできる。例えば、MNCs をマウス抗ヒト CD3、CD4 及び/又は CD8 抗体とともにインキュベートする。これを洗浄後、細胞をヒツジ抗マウス免疫磁気ビーズとともにインキュベートし、未結合の細胞を回収する。CD3、CD4 及び CD8 はいずれも T 細胞のマーカー(表面抗原)であるため、これらの抗原に対する抗体を用いて上記処理を行うことにより、T 細胞が除去される。

このようにして得られる前駆細胞の細胞表面抗原は、CD3 陰性(CD3⁻)、CD4 陰性(CD4⁻)、CD8 陰性(CD8⁻)である。次に、T 細胞を除去した試料を抗ヒト CD34 ミクロビーズとともにインキュベートする。この操作により、CD34⁺を表す造血前駆細胞を得ることができる。そして、濃縮された CD34⁺細胞の純度が好ましくは 90% 以上となるように、細胞を磁気カラムにかける。

成熟造血細胞は、造血幹細胞および造血前駆細胞などの増殖能力を利用して、特にサイトカインなどの助けを必要とすることなく得ることができる。ただし、G-CSF、Steel factor、GM-CSF、TPO、EPO などのサイトカインを投与することで、特定の分画を効率良く得ることも可能である。

本発明の動物は、レシピエント動物を予め放射線全身照射した後、所定の量に調製した造血前駆細胞又は成熟造血細胞をレシピエント動物(NOD/SCID/B2M、NOD/SCID/IL2rg-null マウス等)に移植することにより得ることができる。移植する細胞数は、動物の種類に応じて適宜定めることができる。例えば、SCID マウスをレシピエントとした場合において、造血細胞を移植するときは 1 匹あたり少なくとも 1×10^3 個であり、上限は特に限定されるものではない。好ましくは、 1×10^3 個～ 1×10^7 個の細胞を使用することができる。多数の細胞により、より高率なヒト細胞の分化が期待できる。

移植は、静脈経由が好ましいが、腹腔、心腔内、肝臓内移植であってもよい。

静脈経由で移植する場合は、顔面静脈、尾静脈などから細胞を注入する。この場合、26~30 ゲージ(G)の注射針（例えば 29G）を用いればよい。例えば、T 細胞が除去された 1×10^5 個の CB 細胞($CD3^-CD4^-CD8^-CD34^+$)を静脈注射により、予め 100cGy の全身照射を受けた幼若な NOD/SCID/B2M マウス、又は NOD. Cg-*Prkdc*^{scid}マウスに
5 移植するのが望ましい。

細胞の移植後、無菌管理を十分に行いながら飼育する。「無菌管理」とは、感染症などの病原微生物や抗原物質を含まないように管理することを意味し、いわゆる SPF(Specific pathogen free) レベルの無菌室での飼育、放射線照射した餌(又は低分子化した餌)を給餌すること、あるいは滅菌水を与えることをいう。マウスの場合は、2 週~16 週、好ましくは 3~4 週の間、上記無菌管理下で飼育すれば、
10 免疫細胞の回収又は免疫に用いることができる。本発明においては、このような飼育された動物も提供される。このような本発明の動物には、その子孫も含まれる。子孫は、無菌環境が維持される限り、通常の交配により得ることができる。

上記の通り得られた「ヒト型化動物」の体内はドナー（ヒト）由来の免疫系が確立されており、ヒト由来の免疫担当細胞などを回収することができる。本発明において、「免疫担当細胞」（免疫細胞ともいう）とは、免疫応答を成立させる細胞を意味し、抗体産生細胞又は造血細胞、具体的には B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞、NKT 細胞などが挙げられる。

免疫担当細胞は、全身免疫、粘膜免疫（後述）のみならず、各組織においても宿主及びその組織を守るという役目を担っている。例えば、皮膚であれば、Langerhans 細胞が抗原提示を行って、真皮において動員される T 細胞、B 細胞が機能する。肝臓においては、Kuppfer 細胞が貪食能力を有している。また、神経系では、Microglia 細胞が、神経変性を予防するべく、不要な物質を貪食する。従って、本発明において、各組織における免疫担当細胞についても、ヒト免疫系を構築している。

これらのヒト由来細胞のレシピエント由来の細胞に対する比率は、造血細胞については 5~90%、好ましくは 20~90% であり、抗体産生細胞については 2~80%、好ましくは 10~80% である。

上記免疫担当細胞は、ドナーであるヒト由来の細胞であり、これらの細胞から各種生理活性物質が産生される。単球や樹状細胞などが、主な抗原提示細胞 (Antigen-presenting cell) として機能する。生理活性物質としては、例えばサイトカイン、免疫グロブリンなどが挙げられる。サイトカインは、各種の血球細胞の増殖と分化を制御するタンパク質性の生理活性物質であり、インターロイキン (IL)、コロニー刺激因子 (CSF)、ケモカインなどを例示することができる。これらサイトカインの異常な分泌や制御の調節破綻が各種病態と密接に関連していることが近年示唆されている。また、これらの産生減少は重症感染症に対して一種の免疫不全状態を呈する可能性が高い。また、免疫グロブリン (Ig) は、抗体の機能及び構造をもつタンパク質であり、アイソタイプには IgG、IgM、IgA、IgD、IgE がある。本発明の免疫グロブリンには、全てのアイソタイプが含まれる。IgG 及び IgA については、それらのサブクラス (それぞれ G1~G4、A1~A2) も存在し、上記免疫グロブリンに含まれる。

B 細胞は表面または細胞内に Ig 受容体を発現するリンパ球であり、IgG、IgM、IgA、IgD などの免疫グロブリン、あるいは IL-6 などのサイトカインを産生する。T 細胞は、免疫応答に関与するリンパ球であって胸腺で分化、成熟する細胞であり、IL-2~IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-14、IL-16 などを産生する。樹状細胞は、免疫応答の開始時に補助細胞 (アクセサリー細胞) として働く樹状突起をもった細胞であり、クラス II 主要組織適合 (MHC) 抗原を発現してヘルパー T 細胞への抗原提示細胞として機能する。NK (ナチュラルキラー) 細胞は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などに対し、MHC 抗原に拘束されずに細胞傷害活性を示す細胞である。NKT (ナチュラルキラー-T) 細胞は、T 細胞受容体及び NK 細胞マーカー (例えば CD16、CD56) を併せ持つ細胞であり、糖脂質である α ガラクトシルセラミド (α GalCer) の刺激により IFN- γ や IL-4 を産生する。

25

3. キメラ現象の確認及び抗体及びワクチンの產生

ヒト由来細胞がレシピエント動物において発現していることの確認は、レシピエント動物の末梢血、骨髄細胞、その他免疫組織を採取して、これらがヒト由来

のものであることを確認すればよい。

例えば、レシピエントを免疫不全マウスとした場合は、移植後 3 週から 3 箇月の間に、末梢血は眼窩後叢から、骨髄細胞は大腿骨と脛骨から採取する。また、脾臓、リンパ節及び胸腺を切除後、細片化し、分離した細胞をメッシュフィルターに通して単一細胞懸濁液を得る。これらの細胞を FACSCalibur 又は FACS Vantage (Becton Dickinson) を用いたヒト CD45(白血球共通抗原、造血系細胞の主要膜糖タンパク質)の発現解析により、ドナー由来の造血細胞であることを同定する。マウス抗ヒト抗体等により染色することも可能である。

また、本発明の動物は、ドナーであるヒト由来の免疫系が確立されている。特に、マウスの場合、骨髄、脾臓、リンパ節、末梢血、胸腺はほぼ 100%に近いヒト細胞で置換されている（以下、このようなマウスを本発明においては「ヒト型化マウス」とも呼ぶ）。従って、免疫担当細胞である B 細胞（抗体産生細胞）、B 細胞を高率に含む脾臓細胞等を抗原又は適当な刺激物質で刺激することにより、ヒト由来抗体を産生させることができる。例えば、本発明の免疫担当細胞を細菌、ウイルス、腫瘍（腫瘍細胞、抗原ペプチド等を含む）の存在下で培養することによりヒト由来抗体の産生を促すことができる。抗体の産生能の測定は、B 細胞の表面抗原は CD19 陽性 (CD19⁺) を表すため、CD19⁺細胞における IgM、IgG、IgD 及び IgA の発現をセルソーター等により解析する。

さらに、本発明の動物を所定の抗原又は適当な刺激物質で免疫し、得られる免疫細胞から抗体を採取することにより、ドナー（ヒト）由来の抗原特異的抗体を得ることができる。例えば、本発明の動物又はその子孫に細菌、ウイルス、腫瘍（腫瘍細胞、抗原ペプチド等を含む）を投与することにより、あるいは、本発明の動物又はその子孫から得た組織又は細胞を細菌、ウイルス、腫瘍（腫瘍細胞、抗原ペプチド等を含む）の存在下で培養することにより、ヒト由来抗体の産生を促し、また、ワクチンを開発することができる。前記の刺激によりパルス（刺激）された樹状細胞は、T 細胞を効率よく誘導できることが知られている。従って、生体内でパルスした樹状細胞を選択して、ワクチンとして応用することも可能である。

抗原又は適当な刺激物質の動物 1 四当たりの投与量は、マウスの場合、 $10\mu\text{g}$ ~ 1mg であり、アジュバントの有無によって適宜調節する。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウム等が挙げられる。

- 5 抗原又は適当な刺激物質の種類は特に限定されるものではなく、タンパク質、ペプチド、レクチンなどが挙げられる。

投与部位は静脈内、皮下、足(food pad)又は腹腔内である。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは 1~2 週間間隔で、1~3 回の免疫を行う。そして、最終免疫後約一週間から二週間後に血清又は血漿中の抗体価を測定し、抗血清又は抗血漿を得る。抗体価の測定は、酵素免疫測定法(ELISA ; enzyme-linked immunosorbent assay)、放射性免疫測定法(RIA ; radioimmuno assay)等により行うことができる。

- 10 15 抗血清又は抗血漿から抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltration、アフィニティーコロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより抗体を精製することができる。

大動物、特に免疫不全ブタをレシピエントとして用いると、抗体産生において量的な利点がある。当該大動物としては、例えば IL7R、IL2R common gamma chain、Jak/Stat, RAG-1、RAG-2などをノックアウトして作製された免疫不全動物が挙げられる。

- 一方、質の高いワクチンの開発には、レシピエントに小動物を用いることが望ましい。小動物では、さまざまなペプチドや抗原などが、ヒト免疫系を有する本発明の動物の生体内でどの程度有効な抗腫瘍効果を有するのか、あるいはペプチド認識効率を有するのかを容易に判定することができる。また、本発明者が開発した白血病細胞の生体内評価システムを用いれば、開発したワクチンや樹状細胞、あるいは T 細胞が、生体内で増殖した白血病細胞などの腫瘍細胞に、どの程度有効であるかも評価することが可能である。

従って、本発明は、被験物質を本発明の動物（幼若個体、生体、子孫、モデル

動物を含む)に投与して、被験物質の有効性を評価することを特徴とする免疫関連医薬のスクリーニング方法を提供する。「免疫関連医薬」は例えば抗体医薬、ワクチン(ペプチドや樹状細胞など)が代表的なものであり、抗ウイルス薬や抗生素などの感染症に対する薬剤も含む。さらに、サイトカイン療法を含む液性因子も広く含む。免疫関連医薬の投与量及び投与方法については、体表面積、体重及び性別を基準として設定することが可能であり、特に静脈内、骨髄内、腹腔、肝臓、皮下などが主たる投与経路である。免疫関連医薬の対象疾患は極めて広く、例えば、腫瘍性疾患、自己免疫疾患、ウイルス性疾患、真菌性疾患、神経性疾患、寄生性疾患、難病、バクテリア性疾患、ミコバクテリウム疾患、関節リウマチやSLEなどの膠原病、白血病やリンパ衆などの造血器悪性疾患、固形腫瘍、良性の造血器および固形腫瘍性疾患、花粉症、アレルギー、アトピー、エイズなどが挙げられる。

また、当該方法は、本発明のヒト抗体に対する免疫応答及びアレルギーに対する安全性確認(特に前臨床試験段階)において有用である。

本発明の動物またはその子孫は、粘膜免疫、消化管免疫、気道免疫もヒト免疫系で構築されている。ここで、粘膜免疫とは、特にIgAなどの分泌型の免疫グロブリンを産生し、粘膜固有のリンパ小節やパイエル板などのT細胞を多数含む組織などにおける免疫をさす。消化管免疫とは、経口摂取により体内に取り込まれる細菌などの抗原に対して、不要なもの又は体に有害となるものを排除するシステム全般をさす。また、気道免疫とは、消化管免疫と同様に分泌型の免疫グロブリンを産生し、気道(鼻腔から気管支、肺胞)を経て侵入する外来性抗原に対する免疫応答全般を含むものである。

本発明のヒト型化動物における粘膜免疫系を利用すると、経口ワクチン開発、消化管感染症の解明、食物アレルギー病態の解明、アレルギー薬開発等を行うことができ、当該免疫系の応用範囲は極めて広いものである。例えば、経口ワクチンには、古典的にはポリオに対するものがよく知られているが、致死的な食中毒を引き起こす0157やコレラ、赤痢などの感染症に対するものが望まれる。本発明の疾患モデル動物若しくはその子孫のから回収される体液(主に血清)若しくは

細胞、又は本発明の免疫担当細胞を上記ワクチンとして用いることができる。

また、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症成長疾患は、免疫系の異常が原因とも言われている。従って、本発明の動物、方法、抗体、ワクチン等を用いたこれらの病態解明、幹細胞移植やT細胞注入などによる新規治療法の開発なども今後応用できる。

また、本発明の動物又はその子孫は疾患モデル動物（特に感染症モデル動物、腫瘍モデル動物）として用いることができる。その中でも、特にウイルス感染症モデル動物として期待される。特にウイルスは、種特異的であるために、ヒトのHIV、HSVなど現在臨床上重要と思われているウイルスはマウスに感染しない。従って、これまでマウスヘルペス、マウスレトロウイルスなど同じ系統のウイルスを用いて感染実験を行うのみで、HIVを直接用いることができないことが問題であった。本発明のモデル動物は、ヒトの免疫系を保有するために、疾患モデルは、細菌、真菌、ウイルスをマウスに感染させることで作製することができる。本発明の疾患モデルは、抗原を $\mu\text{g}\sim\text{mg}$ 単位において、様々な量を投与することで得ることができる。投与経路は、前述したとおり、静脈、骨髄、肝臓、腹腔、皮下などを例示することができる。抗原については、細菌、真菌、ウイルスの他、OVAだけではなく、タンパク、ペプチド、細胞などをふくむ。

例えば、本発明者はすでに、HIV、HTLV-1などのウイルスの生体内での観察において、彼等が宿主とするヒトCD4陽性細胞が、マウス体内で、例えば幹細胞から分化し、成熟T細胞が直接生着することを効率に確認している。従って、上記のウイルスを含めた数々の臨床上問題となるウイルスの感染実験に用いることが期待される。

4. その他のキメラ現象の試験

25 (1) 組織学的解析

レシピエントマウスを解剖後、組織を固定化又は凍結する。パラホルムアルデヒド固定化組織は、段階的な濃度のアルコールを用いて脱水し、パラフィンに埋め込むことが好ましい。ミクロトーム又はクライオスタット等を用いて切片を作

製し、それぞれの切片について、通常の免疫組織染色を行うことができる。

(2) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法

FISH 法とは、染色体の遺伝子座位を決める周知技術であり、蛍光物質などにて標識した一本鎖プローブ DNA を染色体 DNA の相補性部位でハイブリダイズさせ、

5 特異的に求める細胞などの部位を顕微鏡下で同定するというものである。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

10 [実施例 1] 免疫不全マウスへのヒト造血細胞の移植

臍帯血 (CB) 細胞を日本赤十字センター臍帯血バンクから得た。書面によるインフォームドコンセントを得た後に、廃棄対象となった臍帯血から CB 細胞を採取した。単核細胞 (MNCs) を、密度勾配 (リンパ球分離培地、ICN Biomedicals) を用いて $370 \times g$ 、30 分間の遠心により CB から単離した。MNCs をマウス抗ヒト CD3、CD4、CD8 抗体 (BD Immunocytometry) とともに、 4°C で 30 分間インキュベートした。洗浄後、細胞をヒツジ抗マウス免疫磁気ビーズ (DYNAL) とともに 4°C で 30 分間インキュベートし、未結合の細胞を回収した。CD34 $^{+}$ 集団を単離するために、T 細胞除去試料を、抗ヒト CD34 ミクロビーズ (Miltenyi Biotech) とともに 40 分間インキュベートした (製造者プロトコールにしたがった。)。細胞を磁気カラムに 2 回通した結果、濃縮された CD34 $^{+}$ 細胞の純度は 90% 以上となった。

上記のように調製した CB 細胞 (CD3 $^{-}$ CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ CD34 $^{+}$ 、 1×10^5 個) を、予め 100cGy の全身照射を受けた新生児 NOD/SCID/B2M マウス (Jackson Laboratory) に静脈注射により移植し、ヒト由来免疫細胞を初めとするヒト免疫系が構築されたマウスを作製した。

25

[実施例 2] マウス生体内におけるヒト由来 B 系細胞の解析

マウス生体内におけるヒトリンパ細胞の再構築の有無を調べるために、ヒト CD45 $^{+}$ 細胞であって CD19 $^{+}$ 細胞 (B 細胞) の移植レベルについて、多重造血組織解析を行

った。

移植後、飼育 3 ヶ月目のレシピエントマウスの骨髓 (BM)、脾臓、末梢血 (PB)、リンパ節 (LN) の中にヒト由来 B 系細胞が存在するか否かを解析した。BM、脾臓、PB、LN を FITC 結合免疫グロブリン及び PE 結合 CD19 で染色した。

5 結果を図 1A 及び図 1B に示す。図 1Aにおいて、a は BM、b は脾臓、c は PB、d は LN から採取した細胞のフローサイトメトリーである。各リンパ組織において、高レベルのヒト CD45⁺CD19⁺細胞が同定された。図 1A の a～d に示す各数値 (それぞれ 64.6, 23.6, 50.1, 44.6) は、各組織から採取した細胞全体の中に占める CD45⁺CD19⁺細胞の比率 (%) を示す。

10 また、図 1B の 16 枚のパネルにおいて、1 段目 (e)、2 段目 (f)、3 段目 (g)、4 段目 (h) のパネルは、それぞれ BM、脾臓、PB、LN 由来の造血細胞を、FITC-結合 IgM (1 列目)、IgD (2 列目)、IgG (3 列目)、IgA (4 列目) 及び PE-結合 CD19 抗体により染色したときの結果を示す。各パネル内の数値は、CD19⁺細胞の中の免疫グロブリンの各クラスを発現する細胞の比率 (%) を示す。例えば e の 1 列目 15 の 90.1 は、IgM を発現する骨髓由来細胞の比率である。

これらの結果から、BM、脾臓、PB、LN の各組織において、ヒト由来免疫グロブリンが高率に発現していることが示された。

次に、マウスにおいて生着したヒトリンパ系細胞の抗原特異性応答を調べるため、実施例 1 で作製したマウスを 100 μg の卵白アルブミン (OVA) で免疫し、OVA 特異的 IgM 及び IgG の存在を ELISA により解析した。レシピエントマウスの血漿を 10 倍 (IgM 解析用) 又は 3 倍 (IgG 解析用) に希釈し、各サンプルについて吸光度を測定した。また、レシピエントマウスから B 細胞を採取し、RPMI/FCS (ウシ胎児血清)/Pokeweed mitogen 培地で 5 日培養した。その後培養上清中の免疫グロブリンを ELISA により測定した。陰性対照として、ヒト血清中の免疫グロブリンを測定した。

結果を図 2 に示す。図 2においてパネル a は IgM、パネル b は IgG についての結果である。グラフは、左から血漿、培養上清、陰性対照 1 (ヒト血清)、陰性対照 2 (陰性対照 1 の血清の 1/10 量) を示す。図 2 より、抗原特異的 IgM 及び IgG

が高率に産生されていることが示された。

〔実施例 3〕 B 系細胞の分化と成熟化

レシピエントマウスの末梢血 (PB)、骨髓 (BM) 及び脾臓からセルソーターによりヒト CD19⁺細胞 (B 細胞) を採取し、B 細胞による IgM、IgG、IgD 及び IgA の発現を調べた。CD19⁺細胞における IgM/IgD の表面発現は PB では 90.0%/54.0%、BM では 19.7%/3.4%、脾臓では 59.0%/22.7% であった。

脾臓細胞をさらにヤマゴボウマイトイジエン (PWM) を用いて試験管内で 5 日間培養した。また、100 μg/ml の OVA で免疫したレシピエントマウスも作製した。続いて、培養上清及び血漿中へのヒト免疫グロブリンの分泌を ELISA を用いて調べた (表 1)。PWM を用いた 5 日間培養の培地 (上清) は、114 ng/ml～19.8 μg/ml の IgM、2.6～47.6 ng/ml の IgG、及び 1.9～5.7 ng/ml の IgA を含んでいた (表 1)。

表 1 ヒト免疫グロブリンの產生

試料	血漿／免疫原	IgM	IgG	IgA
1	血漿／OVA	225000	823	553
2	培地／OVA	19800	47.6	5.7
3	血漿	23000	13	40
4	培地	114	2.6	1.9
5	血漿	47700	4.1	10.3
6	血漿	17200	5	9.4

15

(產生量単位 : ng/ml)

レシピエントマウスから採取した血漿は、17.2～225 μg/ml の IgM、4.1～823 ng/ml の IgG、及び 9.4～553 ng/ml の IgA を含んでいた。

表 1 に示す通り、レシピエントマウスを OVA で免疫した場合、ヒト B 細胞は、OVA 特異的 IgM を含めて、多量の IgM、IgG 及び IgA を分泌した。従って、本実施例において、新生児 NOD/SCID/B2M マウスにおいて産生されるヒト B 細胞は、成熟してヒト由来 IgM 及び IgD を産生し、さらに抗原特異的かつヒト由来の IgM、IgG

及び IgA を產生する機能を有することが示された。

これらの知見から、本発明のマウスにより得られる B 細胞は、ヒト抗体產生細胞として使用するに止まらず、重症感染症の病原微生物や腫瘍に対するヒト免疫グロブリン（モノクローナル抗体）を產生するため極めて有用であることが示さ
5 れた。

[実施例4] マウス生体内におけるヒト由来T系細胞の解析

本実施例では、レシピエントマウスの BM、脾臓及び PB におけるヒト T 細胞の存在 (CD45 及び CD3)についてフローサイトメトリー解析を行なった。

10 結果を図 3 に示す。図 3 a～c の各パネルはそれぞれ BM(a)、脾臓(b)、PB(c)の解析結果である。T 細胞は、B 細胞と比較して少數ではあるが分化しており、レシピエントへの移植後 3 箇月目の CD3⁺細胞は、BM で 0.17%、脾臓で 1.44%、PB で 1.8%であった。

15 HLA⁻DR⁺CD11c⁺表現型を特徴とする抗原提示細胞 (APCs) は、BM で 1.09% (図 3 d) であった。なお、胸腺において、CD19⁺IgM⁺の B 細胞が同定された (図 3 e)。

[実施例5] リンパ系組織の FISH 解析と免疫蛍光分析

in situ でのヒトリンパ細胞の分布を調べるために、レシピエントマウスに由來する脾臓を用いて、ヒト及びマウス染色体について二重 FISH 解析を行なった。
20 FISH は、常法に従った (Vysis)。サンプル解析には、レーザースキャニング共焦点顕微鏡 (LSM510Meta: Carl Zeiss) を用いた。

ヒト X 染色体プローブを用いた実験から、FACS 分析の結果に矛盾しない高頻度のヒト細胞が得られた。ヒト及びマウス X 染色体を用いた二重 FISH 分析から、マウス起源の間質細胞も、脾臓に存在することが明らかとなった (図 4)。

25 ヒト細胞は、緑色のシグナル (ヒト X 染色体) として同定された (図 4 a)。レシピエントマウス由来の脾臓細胞の一部は、マウス抗ヒト CD3 で赤色に染色された (図 4 c)。図 4 b はパネル a と b を重ね合わせた図であり、青く染まっている箇所は核を示す。

レシピエントマウスは、移植前にはいずれの成熟リンパ細胞も欠いているが、ヒト CB 由来 T 細胞除去 CD34⁺細胞を移植することにより、マウス内でヒト由来リンパ系組織をうまく再構築することができた。

また、組織標本について免疫組織染色を行なった。マウスから採取した脾臓組織の免疫組織染色の結果を図 4 d 及び e に示す。大多数の脾臓細胞は、抗ヒト IgM 陽性 (d)、抗ヒト IgD 陽性 (e) に赤く染色され、極めて高率にヒト由来脾臓細胞が生着していることが示された。さらに、脾臓組織をマウス抗ヒト CD3 で染色した結果、脾臓の一部が抗ヒト CD3 で陽性（赤色）に染色された（図 4 f）。そして、濾胞樹状細胞に対する特異抗体を用いて免疫染色を行うことにより、ヒト APCs の存在も確認することができた（図 4 g）。

〔実施例 6〕 異種宿主におけるヒト細胞の多細胞系再構築

本実施例は、造血細胞によって再構築される「ヒト型化マウス」を開発することを目的とした。ヒト CB 造血幹細胞／前駆体細胞のレシピエントには、新生児 NOD/SCID/IL2rg-null (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*IL2rg*^{null}/Sz) マウス (Jackson Laboratory) を用い、当該マウスへのヒト造血幹細胞の移植は実施例 1 に記載の方法とほぼ同様の方法で行った。臍帯血 (CB) 細胞は日本赤十字センター臍帯血バンクから得た。書面によるインフォームドコンセントを得た後に、廃棄対象となった臍帯血から CB 細胞を採取した。マウス抗ヒト CD3、CD4、CD8、CD11b、CD19、CD20、CD56 及びグリコホリン A モノクローナル抗体 (BD Immunocytometry) を用いて単核細胞 (MNCs) から Lin (lineage-antigen) 陽性細胞を除いた。CD34⁺造血幹細胞集団を高純度で単離するために、単核細胞を抗ヒト CD34 ミクロビーズ (Miltenyi Biotech) とともに 10°C で 30 分間インキュベートし (製造者プロトコールにしたがった。)、細胞を磁気カラムに 2 回通した。その結果、濃縮された CD34⁺細胞の純度は 95% 以上となり、CD19⁺細胞及び CD3⁺細胞の割合は 0.1% 以下となった。上記のように調製した Lin⁻CD34⁺細胞 (1×10^5 個) を静脈注射により移植する前に、予め新生 NOD/SCID/IL2rg-null マウス及び NOD/SCID/β_{2m}^{null} マウスに 100cGy の全身照射を施した。

NOD/SCID/IL2rg-null マウスは、成熟 B 及び T 細胞が完全に欠損していることに加えて、NK 細胞の活性レベルが著しく低いために、当該マウスをレシピエントに用いる場合には、異種細胞を拒絶する危険性を低下させることができる。また、新生児は免疫的に未成熟であるため、新生児レシピエントが成長する間に、ヒト幹細胞は定着し、そこから分化した造血系の細胞を得ることができる。実際、1 × 10⁵ 個の Lin⁻CD34⁺細胞は、レシピエントマウスの BM に効率的に移植され、1 次または 2 次リンパ臓器において多細胞系統の分化した細胞を生じさせた。

実施例 2 と同様に、移植後 3 ヶ月目のレシピエントマウス生体内におけるヒト由来 B 系細胞を解析した。FACSCalibur (Becton Dicinson) を用いてヒト CD45 とその系列マーカー (lineage marker) の発現を解析した。その結果、レシピエントマウスの造血系において、全てのヒト造血系構成要素を含んでいた。レシピエントマウスの BM では、ヒト GPA⁺赤血球は 9.5 ± 6.2 % (n=5)、ヒト CD41⁺巨核球は 1.64 ± 0.42 % (n=5) の頻度で存在した (図 5 A)。

また、ヒト CB 由来 Lin⁻CD34⁺細胞は、BM 内で CD33⁺脊髄細胞、CD19⁺B 細胞、及び CD3⁺T 細胞を產生した (それぞれ図 5 B~D)。

この NOD/SCID/IL2rg-null マウスの優位性を評価するために、既存のマウスの系統の中で最も移植効率のよいと考えられている NOD/SCID/β2m^{null} マウス (NOD/LtSz-Prkdc^{scid}/Prkdc^{scid}/B2m^{null}) (Jackson Laboratory) と移植レベルについて比較した。1 × 10⁵ 個の Lin⁻CD34⁺由来のヒト CB 細胞を NOD/SCID/β2m^{null} マウスに、又は NOD/SCID/IL2R-γc^{null} マウスに移植した。そして、移植 3 ヶ月後のレシピエントマウスの BM、脾臓、及び末梢血 (PB) におけるヒト CD45⁺ 細胞の移植レベルを解析した。

その結果、PB では、NOD/SCID/IL2rg-null マウス (68.9 ± 11.6%、n=5) は NOD/SCID/β2m^{null} マウス (12.4 ± 5.9%、n=5) に比べてヒト細胞の移植レベルが有意に高く、ヒト成熟赤血球 (図 5E) 及び血小板 (図 5F) の両方が、ヒト白血球と共に確認された。NOD/SCID/IL2rg-null マウスは BM (72.9 ± 9.8%、n=5) 及び脾臓 (54.5 ± 8.0%、n=5) においても高率の移植レベルを示した (表 2)。

BM、脾臓と同じく末梢血においてもヒト細胞が循環するために、特に外因性の

抗原またはサイトカインで刺激される場合に、ヒト細胞の遊走や流動を解析することが可能である。

表2 NOD/SCID/ β 2m^{null} マウス及び NOD/SCID/IL2rg-null マウスにおけるヒト
5 CD45⁺細胞のキメラ化

Strain	Mouse	BM	Spleen	PB
NOD/SCID/ β 2m ^{null}	1	46.1%	22.0%	10.4%
	2	31.5%	24.3%	11.6%
	3	18.1%	20.7%	6.9%
	4	30.4%	31.2%	20.7%
mean +/- SD		31.5 +/- 11.5%	22.6 +/- 4.7%	12.4 +/- 5.9%
NOD/SCID/IL2rg-null	1	70.9%	66.8%	71.2%
	2	81.4%	47.1%	81.7%
	3	58.8%	49.5%	50.1%
	4	83.1%	51.1%	68.0%
	5	70.1%	58.1%	73.3%
mean +/- SD		72.9 +/- 9.8%	54.5 +/- 8.0%	68.9 +/- 11.6%

[実施例7] NOD/SCID/IL2rg-null におけるヒト免疫系の分化

実施例6により、レシピエントマウス (NOD/SCID/IL2R- γ c^{null} マウス) の免疫系において、ヒトB細胞、T細胞及び樹状細胞の存在を確認できた。B細胞発生の各段階、つまり、CD19⁺CD20^{hi} 成熟B細胞(図6A、D)、CD10⁺CD19⁺未成熟B細胞(図6B、E)及びCD34⁺CD19⁺pro-B細胞(図6C、F)は、移植されたマウスのBM(図6A-C)及び脾臓の両方で確認できた(図6D-F)。

続いて、移植後3月におけるヒト免疫グロブリンの各アイソタイプの発現を、BM、末梢血(PB)及び脾臓(SP)由来のヒトCD19⁺細胞において調査した。

15 結果を図7に示す。各ドットプロット中の数字は、細胞由来を示す各マーカー

別の抗体と各免疫グロブリンクラスの抗体とに両陽性を示した細胞の割合 (%) を示す。図 7 は、リンパ組織で分化する CD19⁺B 系細胞において免疫グロブリンが発現することは、当該リンパ組織がヒト免疫系に変化したことを示している。そして、BM においては B 前駆細胞が保たれ発現し、末梢血 (PB) では成熟 IgM⁺ 及び IgD⁺B 細胞が産生された (図 7)。BM 及び脾臓においてヒト IgA⁺B 細胞が存在することは、ヒト細胞によって粘膜免疫系が再構築されることを示している。

次に、上記 B 細胞の機能を調べるために、レシピエントの血清に含まれるヒト免疫グロブリンの産生量を ELISA 法により定量した。ヒト CB 由来 Lin⁻ CD34⁺ 細胞の移植 3 月後の NOD/SCID/ β 2m^{null} マウス及び NOD/SCID/IL2rg-null マウスを用いて、血清中のヒト IgM 及び IgG 抗体産生量を ELISA により解析した。

その結果、検査した全てのレシピエントの血清においてヒト IgM ($600 \pm 197 \mu\text{g/ml}$ 、n=3) 及びヒト IgG ($256.7 \pm 76.4 \mu\text{g/ml}$ 、n=3) が存在した。従って、本実施例により、ヒト免疫グロブリンが効果的に産生することを確認することができた (表 3)。

15

表 3 レシピエントマウス血清中のヒト IgM 及び IgG の産生

Strain	Mouse	IgM ($\mu\text{g/ml}$)	IgG ($\mu\text{g/ml}$)
NOD/SCID/IL2rg-null	1	820	190
	2	540	240
	3	680	340
	mean +/- SD	600 ± 197	256.7 ± 76.4

移植された前記の NOD/SCID/ β 2m^{null} マウス及び NOD/SCID/IL2rg-null マウスにおける免疫グロブリン産生レベルの大きな違いは、レシピエントの血清中のヒト IgG クラス抗体量においてみられる。すなわち、効果的なクラススイッチが、NOD/SCID/IL2rg-null レシピエントマウスにおけるヒト免疫系への変化によって調節されていることを示すものである。

次に、異種宿主におけるヒト T 細胞の発生を解析した。胸腺(図 8 A)及び脾臓(図 8 B)におけるヒト T 細胞の発生をフローサイトメトリーで解析した。

結果を図 8 に示す。胸腺では未成熟 CD4⁺CD8⁺二重陽性 T 細胞が 88.1%を占めたのに対し(A)、2 次リンパ組織である脾臓では CD4⁺CD8⁻または CD4⁻CD8⁺といった一重陽性ヒト T 細胞が大部分を占めた(B)。

さらに、免疫蛍光試験によって移植された T 細胞を同定した。胸腺における T 細胞を抗ヒト CD4 抗体(図 8 C)及び抗ヒト CD8 抗体(図 8 D)で染色した。パラホルムアルデヒドで固定した切片を、温めたクエン酸バッファーで処置し、抗体で免疫染色した。検出はレーザースキャニング共焦点顕微鏡(LSM510Meta: Carl Zeiss)を用いた。図 8 E は、図 8 C と D との重ね合わせ像であり、これにより、胸腺細胞の大部分は CD4 と CD8 の 2 重陽性であることが示された。一方、脾臓を抗ヒト CD4 抗体(緑)と抗ヒト CD8(赤)で染色すると、CD4 または CD8 一重陽性の T 細胞が優性であった(図 8 F)。

以上の結果より、免疫染色によって、レシピエントの胸腺において CD4⁺CD8⁺T 細胞、CD4⁺CD8⁻T 細胞、CD4⁻CD8⁺ヒト T 細胞が組織的構造を形成していることが明らかとなった。脾臓のような 2 次リンパ組織では、一重陽性 T 細胞は 1.39 ± 0.61 ($n=5$, 0.94–2.43) CD4/CD8 比で存在した。上記結果は、ヒト CB-幹細胞／前駆体細胞由来 T 細胞が成熟及び増殖刺激を受けることを示しており、このことは、ヒト生体におけるものと同一であることを意味する。

抗原に対する免疫応答が最適に変化するには、樹状細胞又は単核細胞が抗原提示細胞として機能することが必要である。そこで、NOD/SCID/IL2R- γ c^{null} マウスの脾臓におけるヒト樹状細胞の存在を検討した。

結果を図 9 に示す。図 9 A には、脾臓における HLA-DR⁺CD11c⁺細胞の存在をフローサイトメトリーで示した。図 9 B は、抗ヒト CD11c 抗体による免疫染色により、ヒト樹状細胞が予想された形態学的特徴を保持していることを示した図である。図 9 A より、HLA-DR⁺CD11c⁺樹状細胞は $1.32 \pm 0.54\%$ ($n=6$) の頻度で NOD/SCID/IL2rg-null レシピエントマウスの脾臓に存在することが示された。また、ヒト CD11c で免疫染色することによって、移植されたヒト樹状細胞はマウス

臓器における形態学的特徴を有することが示された（図 9B）。レシピエントの脾臓において、ヒト CD19⁺細胞及び CD3⁺細胞により組織化された構造が形成することに伴い（図 9C 及び D）、異種リンパ組織においてヒト免疫系が機能的に再構築することが、ヒト樹状細胞の存在によって示された。

5 以上の結果から、免疫系において必要不可欠な 3 つの要素であるヒト由来 T 細胞、B 細胞及び抗原提示細胞は、異種宿主（マウス）において適切な成熟を伴つて CB Lin⁻CD34⁺細胞から高率に分化することが示された。

[実施例 8] ヒト粘膜免疫の再構築

10 胃腸管系の組織は、外因性の抗原に対する粘膜免疫による宿主防御を支える主要な部位である。本発明者は、レシピエントマウスの BM 及び脾臓において IgA⁺ B 系細胞の存在することを確認したことから、異種宿主の消化管においてヒト免疫細胞が存在するかを調べた。胃から直腸にかけての消化管をマウスから摘出し、PBS で染色した後、3% パラホルムアルデヒドで 1 時間室温で固定した。パラフィン包埋サンプルを 5 μm にスライスし、免疫染色に用いた。免疫蛍光試験はレーザースキャニング共焦点顕微鏡を用いた。

結果を図 10 に示す。図 10 は、NOD/SCID/IL2rg-null マウスの消化管における粘膜免疫の発生を示している。図 10 A 及び B は、DAPI による核染色とともに、抗ヒト CD3 抗体（A、緑）及び抗ヒト IgA 抗体（B、赤）で免疫染色することによって、レシピエントマウスの腸管標本においてヒト粘膜免疫が存在することを示す。図 10 C は、絨毛の輪郭を DIC イメージングによって明らかにした図である。図 10 D は、A、B 及び C の像を重ね合わせたものである。図 10 A～D から、免疫蛍光試験によって、レシピエントマウスの腸管絨毛にヒト IgA⁺ B 細胞及びヒト CD3⁺ T 細胞が共に含まれていることが示された。つまり、この結果は、粘膜免疫がヒト Lin⁻CD34⁺幹細胞／前駆細胞によって再構築されたことを示している。加えて、移植マウスの回腸の漿膜下で節構造が認められた（図 10 E）。

Peyer's パッチ様構造を、抗ヒト IgA（赤）、及び抗ヒト CD3（緑）抗体で染色すると、上皮下ドームにおいてヒト T 細胞を豊富に含んでいることが明らかとなる

った（図10F）。以上のように、マウス腸間膜リンパ節もヒト細胞によって著しく再構築されていた。したがって、本発明のモデルは、胃腸管におけるヒト粘膜免疫系の役割を解析するための実験動物として有用である。

5 [実施例 9] 移植された B 細胞による抗原特異的免疫グロブリンの產生

ヒト免疫系の組織的な応答を調べるために、そして *in vivo* における抗原特異的なヒト抗体の產生を調べるために、移植 3 月後に 3 匹の NOD/SCID/IL2rg-null レシピエントマウスに 2 回卵白アルブミン（ $100 \mu\text{g}$ 、sigma）で免疫した。卵白アルブミンは、 $100 \mu\text{g}$ の水酸化アルミニウム（sigma）で乳化させて用いた。当該免疫後のフローサイトメトリーによって解析した結果、2 回免疫後 2 週間経たレシピエントマウスの BM において、ヒト CD38⁺IgG⁺細胞が効果的に誘導されていることが示された（図11）。図11A 及び B は卵白アルブミン免疫前及び後におけるレシピエントマウスの BM 細胞を、フローサイトメトリーによってヒト IgG⁺細胞の存在によって分析した図である。

15 次に、免疫化レシピエントマウスの血清を用いて、卵白アルブミン特異的なヒト IgM 及び IgG の產生を測定した。上記の 3 匹の免疫化マウス、即ち NOD/SCID/IL2rg-null レシピエントマウスを卵白アルブミンで免疫した 2 週間後に、レシピエントマウスの血清を採取し、卵白アルブミン特異的なヒト IgM 及び IgG の存在を ELISA 法によって解析した。ヤギ抗ヒト IgM 及び IgG 抗体は、Bethyl から購入し、これらはマウス抗ヒト IgM 及び IgG 抗体とクロス反応しないことを確認した後に用いた。免疫をしていない NOD/SCID/IL2rg-null レシピエントマウス由来の血清を、非特異的 IgM 及び IgG 対照として用いた。卵白アルブミン特異的なヒト IgM 及び IgG 抗体を解析するために、96 マルチウェルプレートの底に、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の卵白アルブミンをプレーティングして ELISA 法に用いた。

25 その結果、ELISA によって、ヒト IgM（図11C 白カラム）及び IgG（図11C 黒カラム）の光学濃度（Optical Density）は、免疫化レシピエント（Recipient）の血清では非免疫化レシピエント（control）と比較して非常に高いことが示された。また、ヒト細胞のキメラ化が高いレベルであることも示された（図11）。卵白アル

ブミンが T 依存性抗原であることを考慮すると、ヒト免疫系特性に変化したヒト樹状細胞、T 細胞及び B 細胞は、異種宿主レシピエントマウスにおいて抗原特異的なヒト IgM 及び IgG の產生をするために調和して機能したものであると考えられる。

5

[実施例 10] アロ抗原特異的なヒト T 細胞の存在

本実施例は、異種宿主のリンパ組織中の Lin⁻CD24^{+CB} 細胞から分化したヒト T 細胞の、アロ抗原特異的な機能を明らかにしたものである。

ヒト T 細胞をレシピエントの脾臓から単離した後、アロ抗原(alloantigen)特異的な CD4^{+T} 細胞株及び CD8^{+T} 細胞株を分化した。CD4^{+T} 細胞株及び CD8^{+T} 細胞株の両者を同種異型(allogenic)の標的細胞(target cells、TAK-LCL)と共に培養し、同種異型標的細胞に対する細胞毒性を調べるために、⁵¹Cr 遊離アッセイを行った。

さまざまな細胞数のエフェクター細胞(Effector cell)と、 1×10^4 個の ⁵¹Cr 標識同種異型標的細胞を、丸底マイクロタイターウェルにて 10%熱非効化ウシ胎児血清を添加した 0.2 mL の RPMI1640 中で培養した。標的細胞は、メディウムのみのウェル、及びメディウムに 1% Triton X-100 の入ったウェルにも添加し、それぞれの遊離量は、⁵¹Cr の自発的な遊離及び⁵¹Cr の最大遊離の値として後の計算で用いた。5 時間後上清 0.1 mL をそれぞれのウェルから回収し、以下の計算式から特異的な⁵¹Cr 遊離量を求めた。

(特異的な⁵¹Cr 遊離量) (%) = (実測値(cpm) - 自発遊離値(cpm)) / (最大遊離値(cpm) - 自発遊離値(cpm)) × 100

HLA 拘束を決定するために、標的細胞を抗 HLA-A, B, C モノクローナル抗体(w6/32) (ATCC) 又は HLA-DR モノクローナル抗体(L243) (ATCC) と 30 分間プレインキュベートし、その後、エフェクター T リンパ球で共培養した。それぞれの細胞毒性アッセイは、少なくとも 2 回行った。

KIN-LCL は、同種異型の標的細胞と、いずれの HLA タイプをも共有せず、陰性対照として用いた(図 1 2、KIN-LCL、(×))。

また、エフェクター細胞と標的細胞の HLA タイプは以下のとおりである。T cells

isolated from recipient spleen, HLA-A24/33, B44/52, Cw12/w14, DRB1*1302/*15021, TAK-LCL, HLA-A24/26, B62/-, Cw4/w9, DRB1*0405/*0901, KIN-LCL, HLA-A01/30, B13/17, Cw6/-, DRB1*0701/*0701.

結果を図12に示す。図12A～Cは、3つのCD4⁺T細胞株それぞれの、刺激細胞濃度(Effectortarget ratio)依存的な細胞毒性(% Cytotoxicity)を示す。ヒトCD4⁺T細胞株による細胞毒性は、標的細胞として用いた同種異型LCL(TAK-LCL)に対して細胞毒性を示した(図12、none、(◆))。異種環境で產生されたヒトT細胞のMHC拘束を調べるために、抗HLAクラスI抗体(anti-HLA class I)及び抗HLA-DR抗体(anti-HLA-DR)を用いて、ヒトT細胞による細胞毒性の阻害アッセイを行った。その結果、細胞毒性はHLA-DR抗体(図12、anti-HLA-DR、(▲))によって阻害されたが、HLAクラスIモノクローナル抗体(図12、anti-HLA-class I、(■))では阻害されなかった。このことは、細胞毒性はHLAクラスIIで拘束されることを示している。

図12D～Fは、3つのCD8⁺T細胞株それぞれの、刺激細胞濃度依存的な細胞毒性を示す。CD8⁺Tによる細胞毒性は、HLAクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、HLA-DR抗体では阻害されなかった。このことは、通常の環境下で產生したCD8⁺CTLによって介されるのと同様に、異種環境下で產生したCD8⁺T細胞によって介される細胞毒性は、HLAクラスI抗体によって拘束されることを示している。

20

産業上の利用可能性

本発明により、新生児免疫不全動物を用いたヒト由来免疫担当細胞の製造方法を提供することができる。本発明の新生児免疫不全動物は、その体内にヒト由來の免疫系を構築することができるため、リンパ系組織の機能解析及びB細胞を用いたヒト由来抗体の作製に有用である。

請求の範囲

1. ヒト由来造血前駆細胞又は成熟造血細胞が移植された幼若な免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）であって、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる前記動物。
5
2. 請求項1記載の幼若な免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）を飼育してなる免疫不全哺乳動物又はその子孫。
3. 幼若な免疫不全哺乳動物が、新生児免疫不全哺乳動物又は胎児免疫不全哺乳動物である請求項1又は2記載の動物又はその子孫。
10
4. 造血前駆細胞が骨髓由来、臍帯血由来又は末梢血由来の細胞である請求項1記載の動物又は請求項2若しくは3記載の動物若しくはその子孫。
5. 免疫担当細胞が、B細胞、T細胞、樹状細胞、NK細胞及びNKT細胞からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項1記載の動物又は請求項2若しくは3記載の動物若しくはその子孫。
15
6. 生理活性物質がサイトカイン及び/又は免疫グロブリンである請求項1記載の動物又は請求項2若しくは3記載の動物若しくはその子孫。
7. 免疫グロブリンが、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEからなる群から選択されるいずれかのものである請求項6記載の動物又はその子孫。
20
8. 免疫不全哺乳動物が免疫不全マウスである請求項1記載の動物又は請求項2若しくは3記載の動物若しくはその子孫。
9. ヒト由来造血前駆細胞又は成熟造血細胞を幼若な免疫不全哺乳動物（ヒトを除く）に移植することを特徴とする、当該ヒト由来の免疫担当細胞、及び/又は当該免疫担当細胞由来の生理活性物質を産生することができる動物又はその子孫の作製方法。
25
10. 幼若な免疫不全哺乳動物が、新生児免疫不全哺乳動物又は胎児免疫不全哺乳動物である請求項9記載の方法。
11. 造血前駆細胞が骨髓由来、臍帯血由来又は末梢血由来の細胞である請求項9記載の方法。

12. 免疫担当細胞が、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 9 記載の方法。
13. 生理活性物質がサイトカイン及び/又は免疫グロブリンである請求項 9 記載の方法。
- 5 14. 免疫グロブリンが、IgG、IgM、IgA、IgD 及び IgE からなる群から選択されるいずれかのものである請求項 13 記載の動物又はその子孫。
15. 免疫不全哺乳動物が免疫不全マウスである請求項 9 記載の方法。
16. 請求項 1 記載の動物又は請求項 2～8 のいずれか 1 項に記載の動物若しくはその子孫から免疫担当細胞を回収し、当該免疫担当細胞を抗原又は刺激物質の存在下で培養し、得られる培養物からヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法。
17. 免疫担当細胞が、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、NK 細胞及び NKT 細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 16 記載の方法。
18. 請求項 1 記載の動物又は請求項 2～8 のいずれか 1 項に記載の動物若しくはその子孫を抗原又は刺激物質で免疫し、得られる免疫動物から当該ヒト由来抗体を採取することを特徴とする前記抗体の製造方法。
19. 抗体の採取源が血漿又は血清である請求項 18 記載の方法。
20. 請求項 1 記載の動物又は請求項 2～8 のいずれか 1 項に記載の動物若しくはその子孫に、細菌、ウイルス、腫瘍細胞及び腫瘍抗原ペプチドからなる群から選択されるいずれかのものが投与された疾患モデル動物又はその子孫。
21. 疾患が感染症である請求項 20 記載の動物又はその子孫。
22. 被験物質を、請求項 1 記載の動物、又は請求項 2～8、20 及び 21 のいずれか 1 項に記載の動物若しくはその子孫に投与して、被験物質の有効性を評価することを特徴とする、免疫関連医薬のスクリーニング方法。
23. 免疫関連医薬がワクチンである請求項 22 記載の方法。
24. 請求項 1 記載の動物又は請求項 2～8 のいずれか 1 項に記載の動物若しくはその子孫から免疫担当細胞を回収することを特徴とする前記免疫担当

細胞の製造方法。

25. 請求項1記載の動物又は請求項2～8のいずれか1項に記載の動物若しくはその子孫から回収された免疫担当細胞。

26. 請求項25記載の免疫担当細胞を含むワクチン。

5 27. 請求項20記載の動物又はその子孫から免疫担当細胞を回収することを特徴とする前記免疫担当細胞の製造方法。

28. 請求項20記載の動物又はその子孫から回収された免疫担当細胞。

29. 請求項28記載の免疫担当細胞を含むワクチン。

30. 請求項1記載の動物又は請求項2～8のいずれか1項に記載の動物若しくはその子孫から回収されたヒト由来抗体。

10 31. 請求項25又は28記載の免疫担当細胞を抗原又は刺激物質の存在下で培養した培養物から採取されたヒト由来抗体。

32. 請求項20記載の動物又はその子孫から回収されたヒト由来抗体。

33. 請求項32記載のヒト由来抗体を含むワクチン。

図 1 A

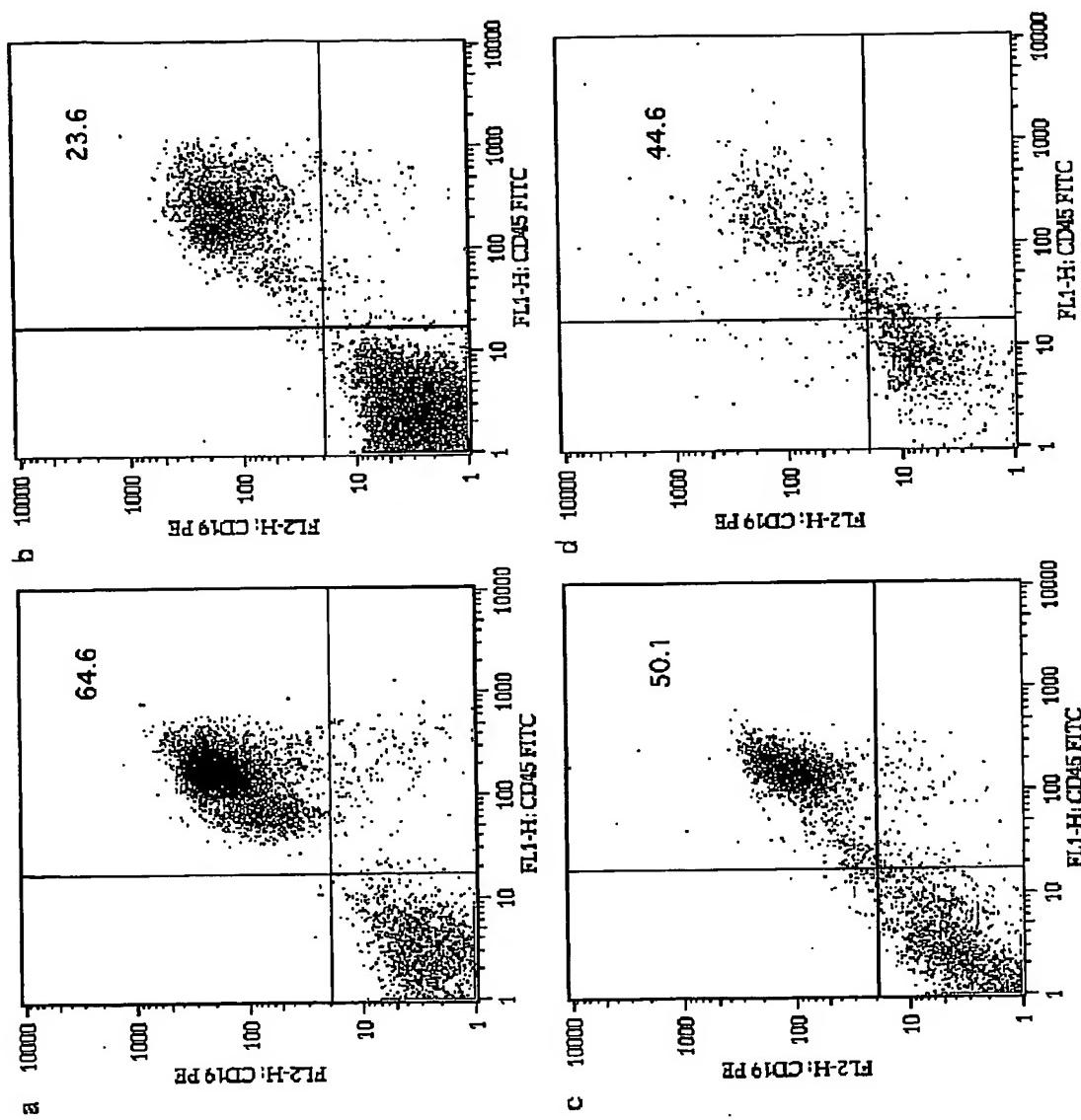


図 1 B

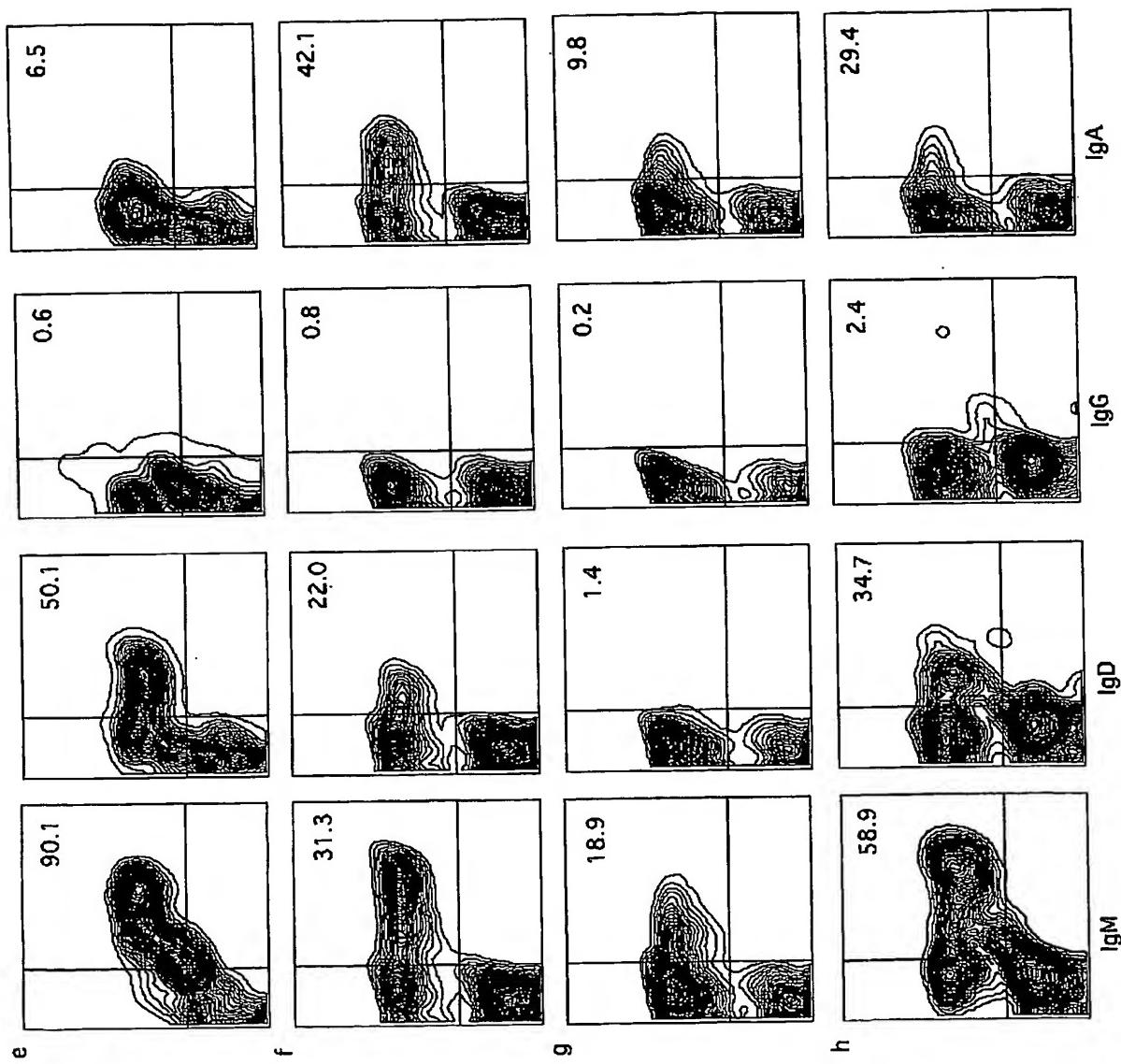


図 2

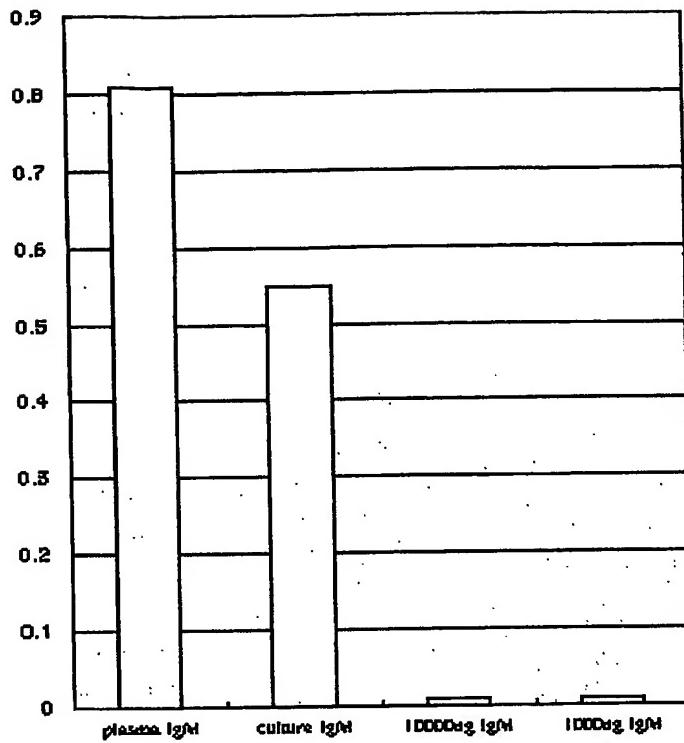
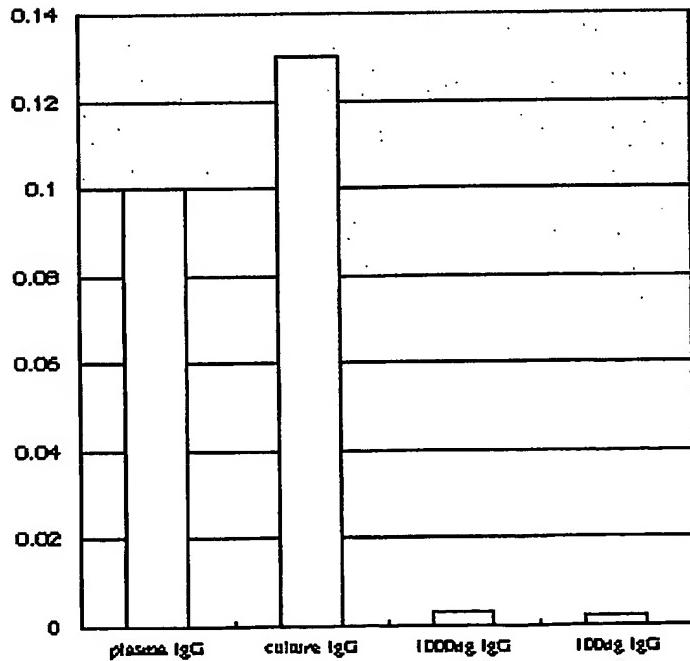
a OD**b**

图3

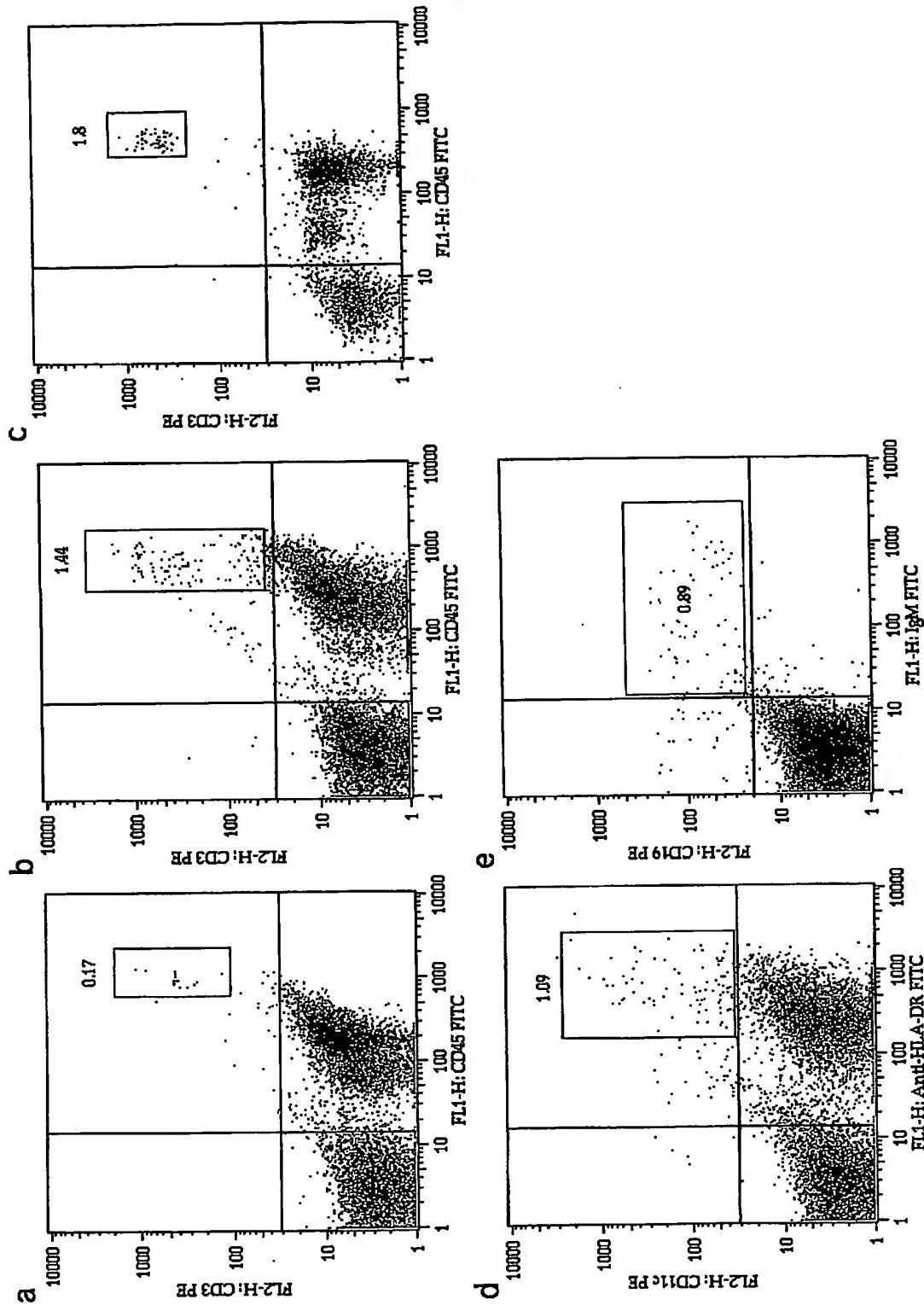


図4

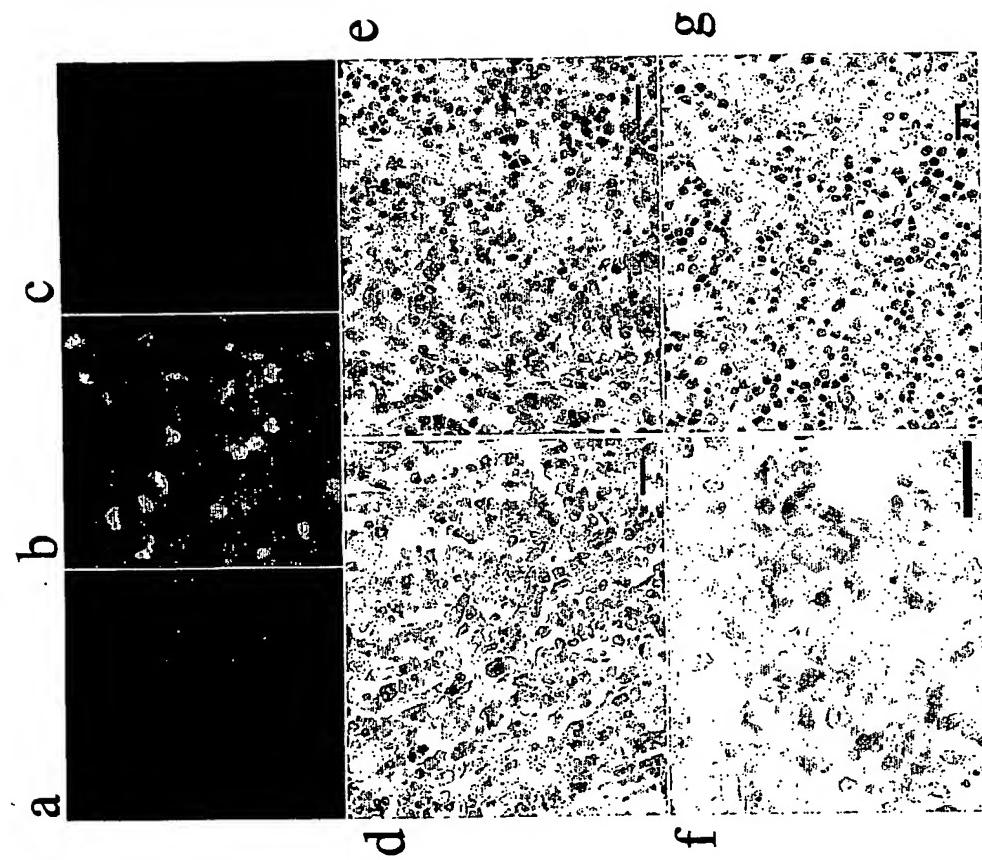


図 5

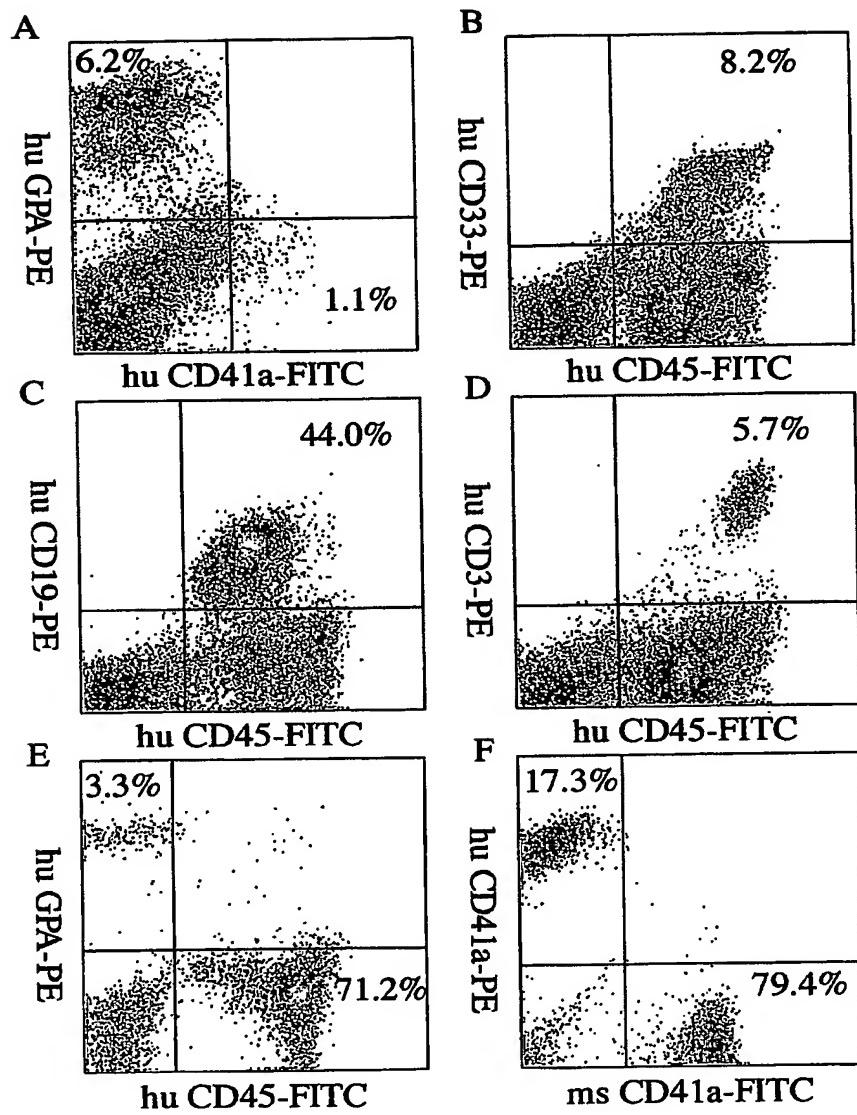


図 6

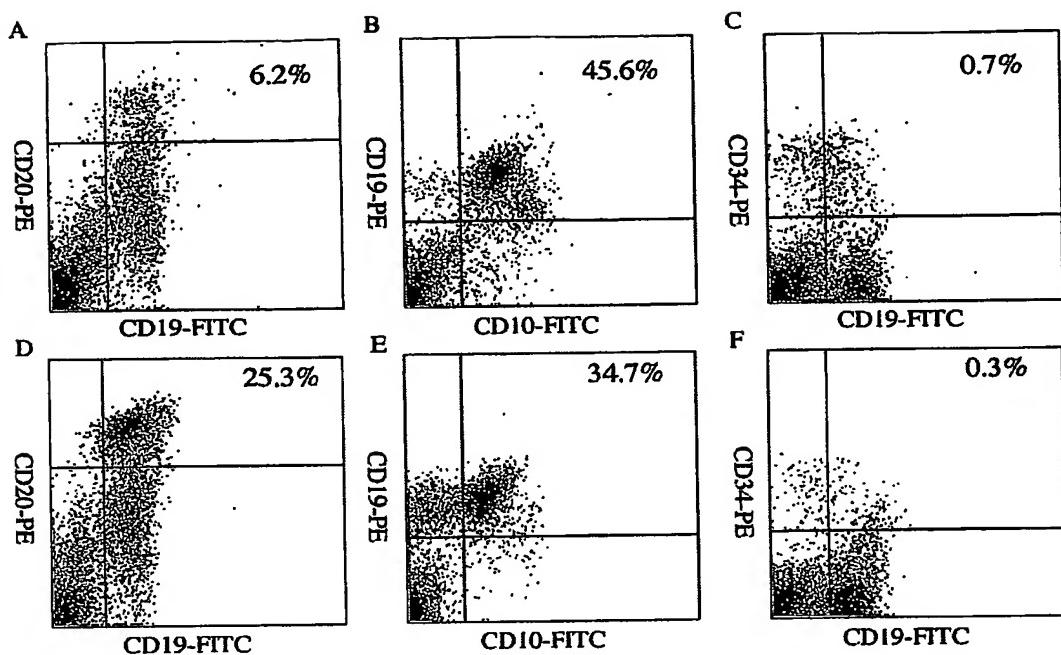
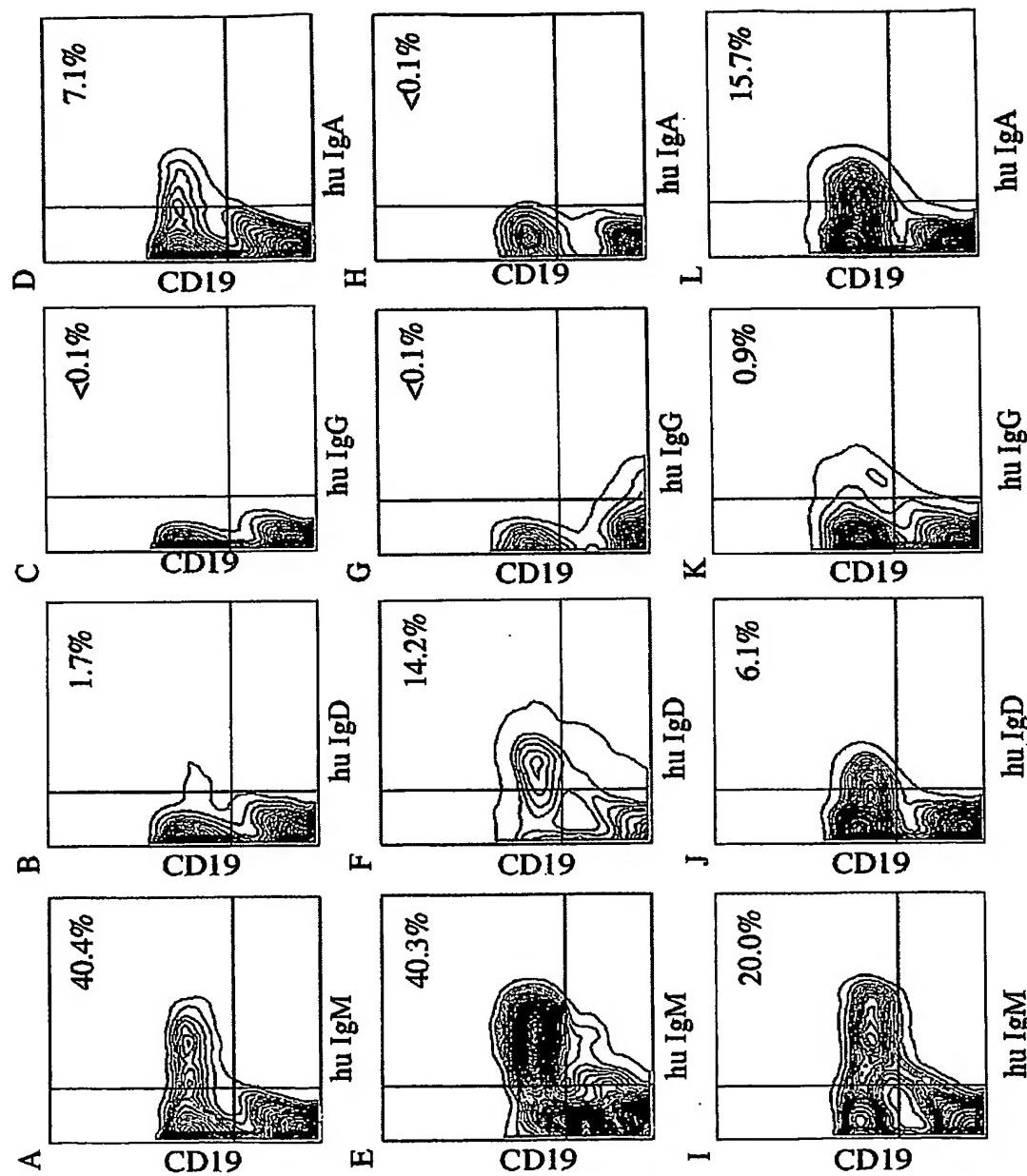


図7



8

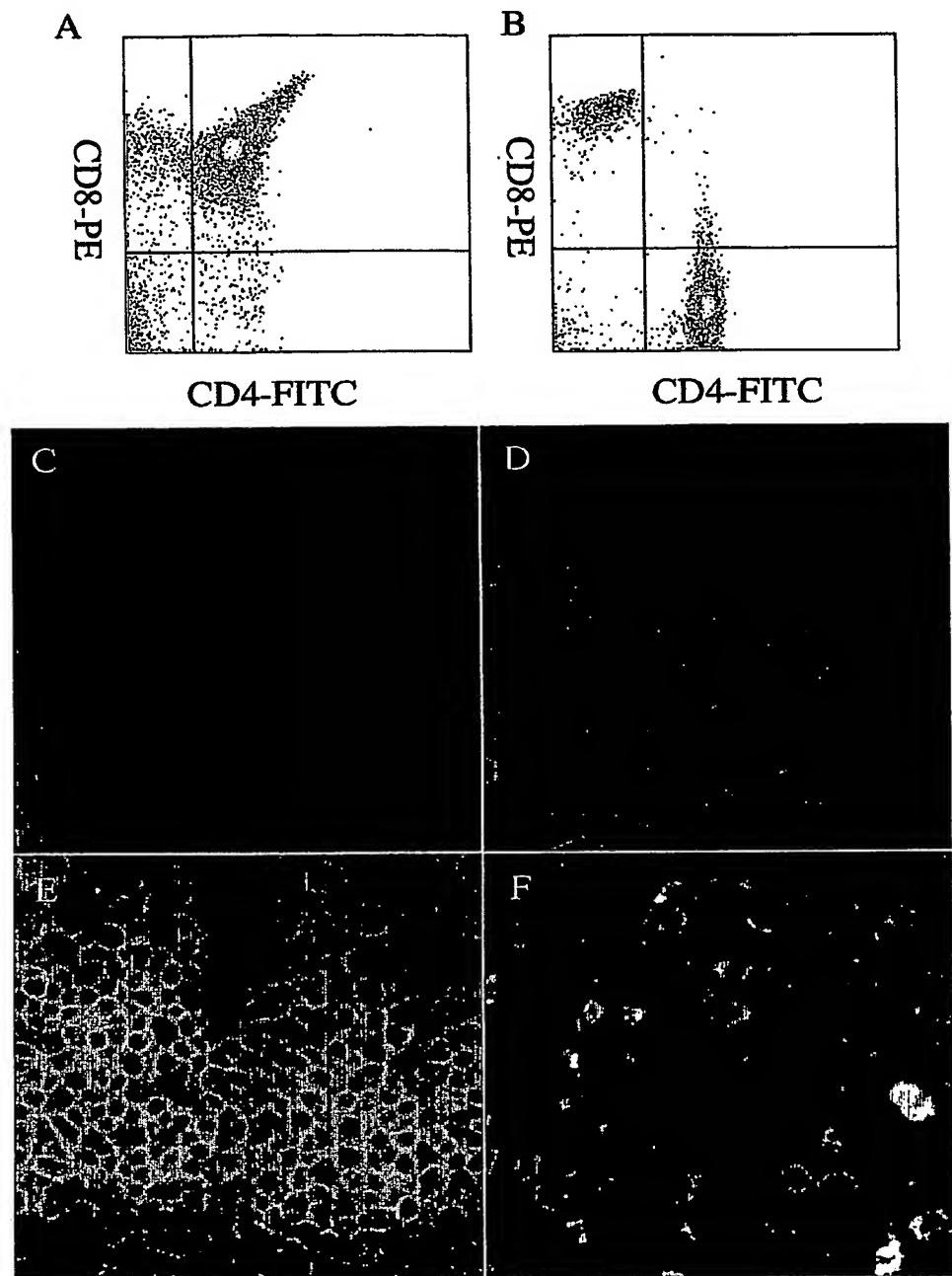


図 9

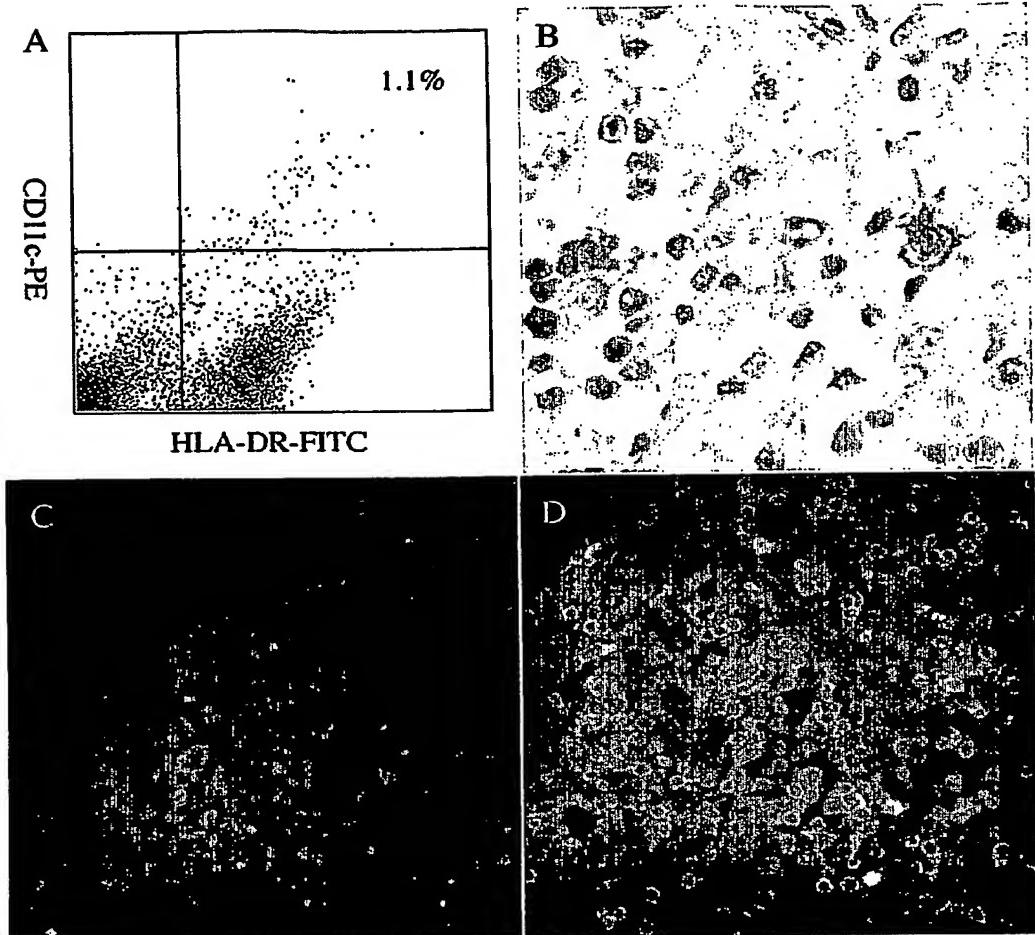


図10

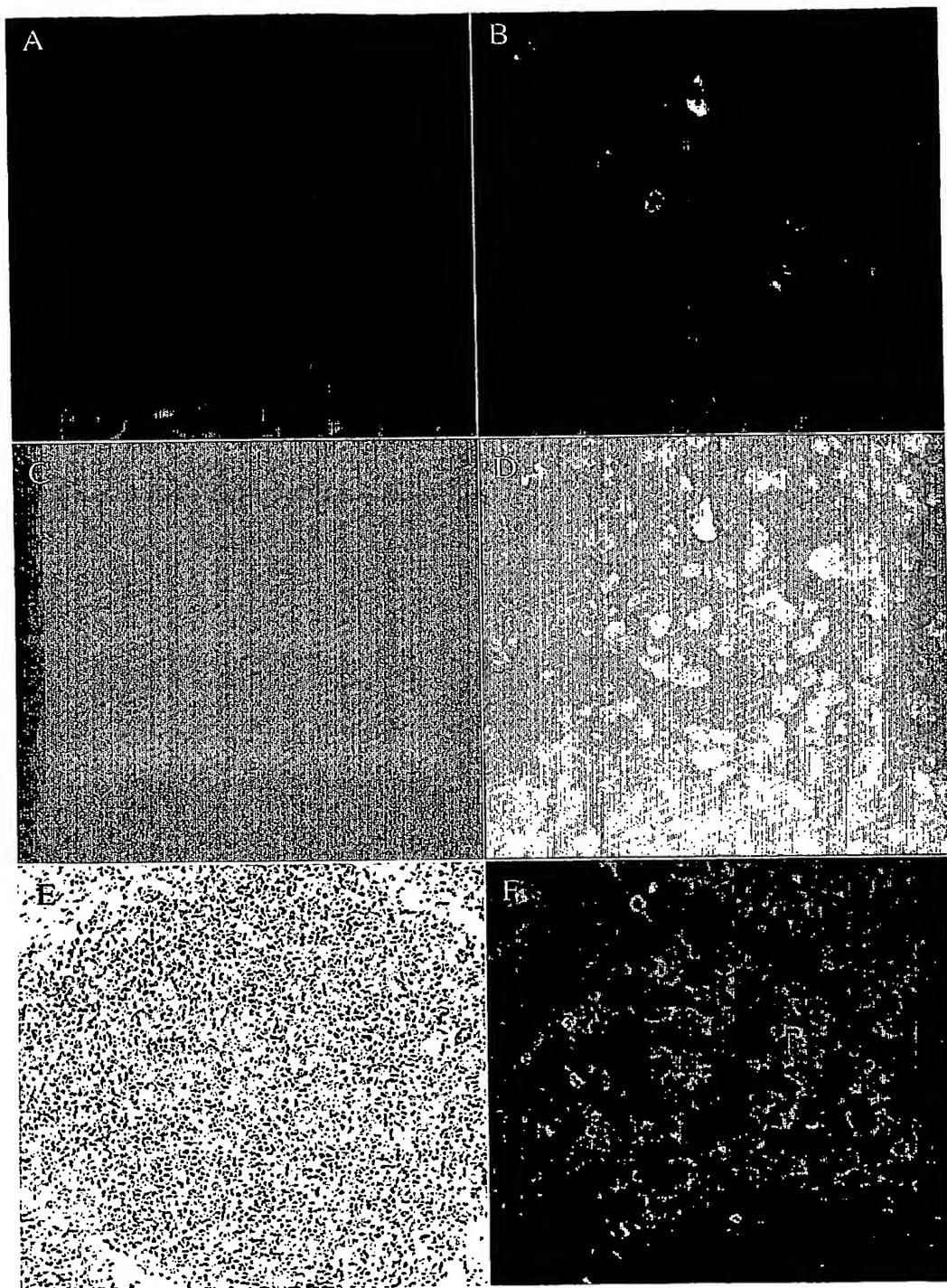


図 11

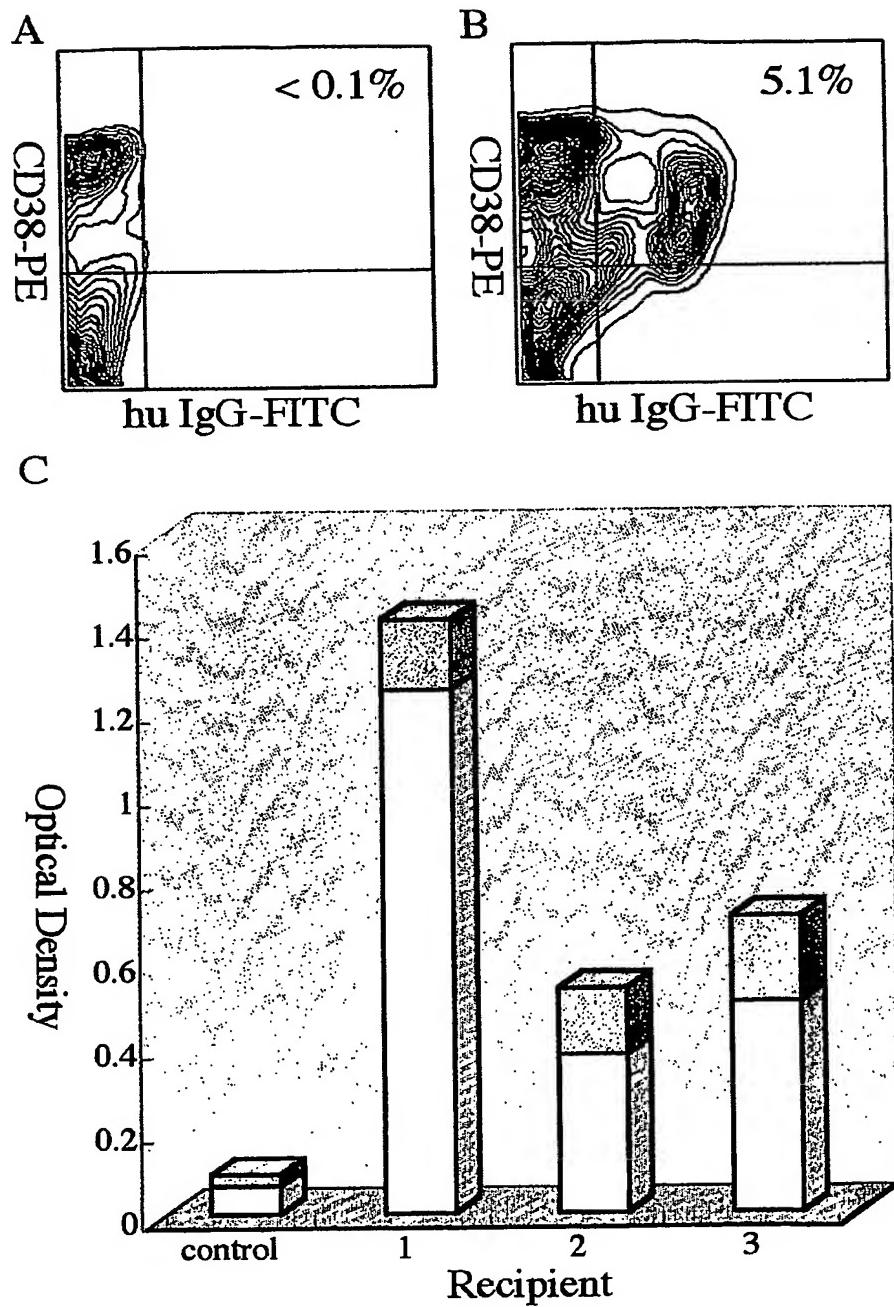
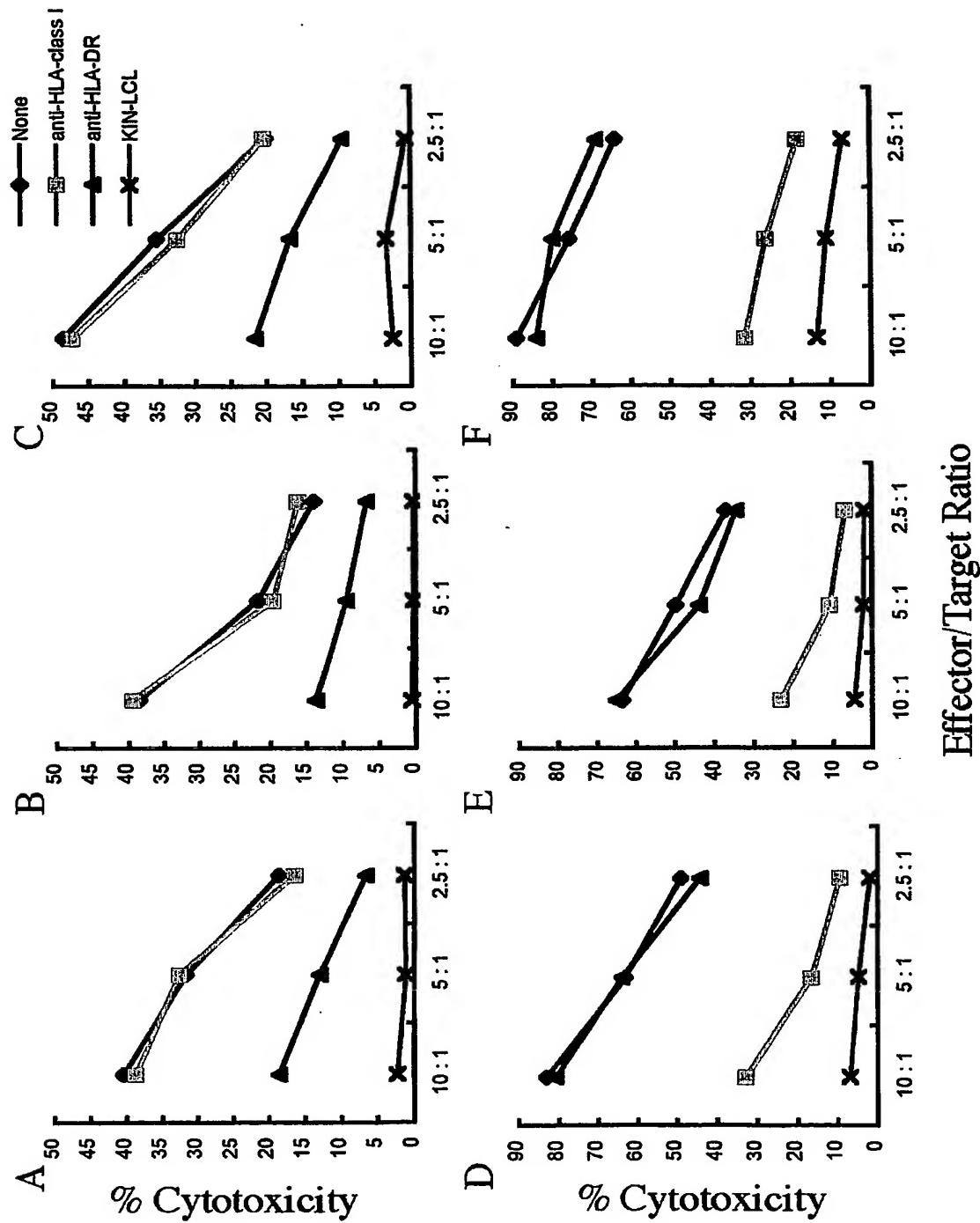


図12



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/008784

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' A01K67/027, C12P21/08, A61K39/395, C07K14/47, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' A01K67/027, C12P21/08, A61K39/395, C07K14/47, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Ishikawa, F. et al., "An assay for long-term engrafting human hematopoietic cells based on newborn NOD/SCID/beta2-microglobulin(null) mice". Experimental Hematology, (2002 May), Vol. 30, No. 5, pp. 488-494,	1-16, 20-24 17-19, 25-33
X Y	Ishikawa, F. et al., "Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice" Annals of the New York Academy of Sciences, (2003 May), Vol. 996, pp. 174-185	1-16, 20-24 17-19, 25-33

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
15.09.2004

国際調査報告の発送日 05.10.2004

国際調査機関の名称及び先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
新留 豊

4B 9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き): 引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Fraser, S. T., et al., "Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin(+) population" Experimental Hematology, (2002 Sep), Vol. 30, No. 9, pp. 1070-1078	1-16, 20-24 17-19, 25-33
Y	Ito, M. et al., "NOD/SCID/γc ^{null} mouse: an excellent recipient model for engraftment of human cells" Blood, (2002 Nov), Vol. 100, No. 9, pp. 3175-3182	1-33
Y	JP 6-500233 A (Genpharm International Inc.), 1994. 01. 13, 特に要約及び請求の範囲参照 & WO 92/03918 A1 & AU 9185071 A & EP 546073 A1 & GB 2272440 A & US 5789650 A	1-33
Y	WO 02/43478 A2 (Medarex, Inc.), 2002. 06. 06, 特に要約及び請求の範囲参照 & CA 2430013 A & AU 3942202 A & US 2002/0199213 A1 & EP 1354034 A	1-33

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.